

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

MÉTODOS DE DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Streptococcus mutans*

DOUTORANDA: MÔNICA MOREIRA

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. VÂNIA APARECIDA VICENTE

CURITIBA

2012

MÔNICA MOREIRA

**MÉTODOS DE DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE *Streptococcus mutans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de Concentração: Saúde Humana e Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vânia Aparecida Vicente.

CURITIBA

2012


RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos vinte e quatro dias do mês de julho de 2012, na sala 129, do Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico da UFPR, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia - PPGEBB, a banca examinadora da septuagésima sétima Defesa de Tese de Doutorado, área de concentração Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do programa, professores, alunos e visitantes. A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do PPGEBB, ficou constituída pelos Professores Doutores Vânia Aparecida Vicente (UFPR), Lygia V. Gallu Terasawa (UFPR), Juliana Bittencourt (UTFPR), Danyelle Stringari (UNESPAR) e José Vicente Teixeira Pinto (UFPR).

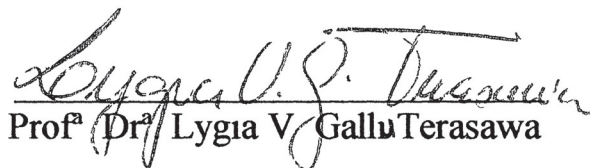
Às 9 horas, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Mônica Moreira** a fazer a apresentação da Tese intitulada "**Métodos de Detecção e Caracterização Molecular de *Streptococcus mutans***". Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a apresentação da tese e a arguição, a banca constituída pelos professores doutores Vânia Aparecida Vicente, Lygia V. Gallu Terasawa, Juliana Bittencourt, Danyelle Stringari e José Vicente Teixeira Pinto declarou a candidata aprovada de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da Resolução 65/09 de 30 10 09).

Curitiba, 24 de julho de 2012



Profª Drª Vânia Aparecida Vicente



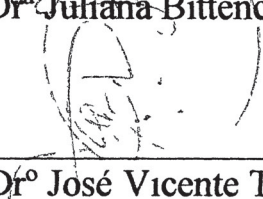
Profª Drª Lygia V. Gallu Terasawa



Profª Drª Juliana Bittencourt



Profª Drª Danyelle Stringari



Profº Drº José Vicente Teixeira Pinto

Universidade Federal do Paraná
Setor de Tecnologia
Curso de Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

AGRADECIMENTOS

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho, especialmente, a coordenadora Professora Luciana Porto de Souza Vandenberghe.

À Prof^a. Dra. Vânia Aparecida Vicente pela amizade e disposição constante nestes anos de convívio, pelo indispensável apoio nos momentos difíceis e orientação técnica e metodológica em todas as fases, contribuindo efetivamente no aprimoramento deste trabalho.

À Prof^a. Dra. Débora do Rocio Klisiowicz pelo estímulo e ajuda com as análises das sequências estudadas.

Aos colegas do Labmicro – Biomol, em especial as dentistas Ivana e Dicler, e as mestrandas Mariana Machado e Germana, pelo incentivo e apoio.

Aos colegas do Labgem, Douglas e Danyelle, pelas importantes contribuições metodológicas no desenvolvimento de algumas etapas.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Básica do Setor de Ciências Biológicas da UFPR pela amizade nestes anos de convívio.

Aos colegas da Unidade de Saúde Augusta, da Secretaria de Saúde de Curitiba, agradeço pela paciência e apoio, durante os anos de dedicação a esta tese.

Aos pacientes do Distrito Sanitário CIC, que concordaram em participar como voluntários nesta pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho,

Meus sinceros agradecimentos!

DEDICATÓRIA

À minha família

Pela torcida e disposição em ajudar nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
OBJETIVO GERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
CAPÍTULO I	
Revisão de Literatura	12
CAPÍTULO II	
Variações metodológicas no isolamento do DNA genômico de bactérias do gênero <i>Streptococcus</i>	21
CAPÍTULO III	
Marcadores moleculares na avaliação da variabilidade de <i>Streptococcus mutans</i> e o risco biológico à cárie na infância	30
CAPÍTULO IV	
Caracterização molecular do gene da Beta-glicosiltransferase em <i>Streptococcus mutans</i> isolados de famílias com alto risco à cárie dental	46
CAPÍTULO V	
Um método efetivo para detecção de <i>Streptococcus mutans</i>, utilizando sonda específica associada à RCA (<i>Rolling Circle Amplification</i>)	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	77
ANEXOS	82
ANEXO I – ARTIGOS PUBLICADOS	
Methodological variations in the isolation of genomic DNA from <i>Streptococcus</i> bacteria	83
Estratégia multidisciplinar na prevenção e controle de doenças de manifestação clínica na infância	87
ANEXO II – ARTIGO SUBMETIDO	
Using molecular markers to assess <i>Streptococcus mutans</i> variability and the biological risk for caries during childhood	94
ANEXO III – SUBMISSÃO DAS SEQUÊNCIAS <i>gtfB</i> EUROPEAN NUCLEOTIDE ARCHIVE	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	- adenina
AMSB	- ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- <i>brain heart infusion</i>
BLAST	- programa do <i>GenBank</i> para análise de sequências
Bootstrap	- teste de confiabilidade
C	- citosina
CIA	- clorofórmio-álcool isoamílico
CPOD	- índice de dentes permanentes cariados, perdidos ou obturados
ceo	- índice de dentes decíduos cariados, extraídos por cárie ou obturados
CTAB	- brometo de cetil trimetil amônio
DNA	- ácido desoxirribonucléico
dNTP	- dinucleotídeo trifosfatado
G	- guanina
GenBank	- banco de dados de sequências genéticas
GtfB	- enzima Beta-glicosiltransferase
GtfC	- enzima glicosiltransferase C
GtfD	- enzima glicosiltransferase D
gtfB	- gene que codifica para a enzima Beta-glicosiltransferase
HE	- <i>European Nucleotide Archive</i>
IGS	- regiões intergênicas 16S-23S
kb	- kilobase
mL	- mililitros
nt	- número de nucleotídeos contidos na sonda
NTSYS	- análise dos dados em pesquisas genéticas, estatísticas ou evolutivas
pb	- pares de base
PCR	- reação de polimerização em cadeia (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PEC	- polissacarídeos extracelulares
pH	- potencial hidrogeniônico
primer	- oligonucleotídeo iniciador
RAPD	- <i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
rDNA	- <i>ribosomal DNA</i>
rRNA	- <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RCA	- amplificação em círculo rolante (<i>Rolling Circle Amplification</i>)
<i>S. mutans</i>	- <i>Streptococcus mutans</i>
ssDNA	- DNA fita simples (<i>single-stranded DNA</i>)
T	- timina
Tm	- <i>melting temperature</i>
UFC/mL	- unidades formadoras de colônias por mililitros de saliva
UPGMA	- <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
µL	- microlitros

RESUMO

A cárie é uma doença infecciosa, determinada por diversos fatores endógenos e exógenos ao indivíduo. O principal agente etiológico relacionado à doença é a bactéria *Streptococcus mutans*, devido a fatores de virulência como capacidade de aderir-se ao esmalte dental e propiciar a formação do biofilme dental, através da produção de polissacarídeos extracelulares. Os exopolissacarídeos, que são glucanos sintetizados a partir da enzima glicosiltransferase, promovem sítios de acumulação de microrganismos na superfície dental, e são enzimaticamente ativos quando expostos a sacarose da dieta. Dentro deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar *S. mutans* por meio de marcador molecular, utilizando o sequenciamento parcial do gene *gtfB* que codifica a enzima Beta-glicosiltransferase, e detectar o microrganismo por meio de sonda baseada na metodologia de amplificação em círculos rolantes (*Rolling Circle Amplification* - RCA). Para o isolamento do DNA genômico de bactérias do gênero *Streptococcus*, dois métodos de extração utilizando brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) foram testados. O método que associou o ultrasson à sílica e celite foi mais eficiente. Com o objetivo específico de identificar a variabilidade genética e a relação de isolados de *S. mutans* com o perfil de colonização e epidemiologia da doença cárie na população infantil, linhagens isoladas da saliva de crianças com diferentes históricos de cárie, foram caracterizadas por marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), e sequenciamento de regiões específicas do gene que codifica a enzima Beta-glicosiltransferase (*gtfB*). Os resultados demonstraram que a variabilidade genética dos isolados pode estar relacionada ao padrão de virulência, justificando assim, as variações observadas nos níveis de colonização dos indivíduos e manifestação clínica da doença. Com o objetivo de identificar a transmissibilidade intrafamiliar de *S. mutans* isolados procedentes de saliva de indivíduos pertencentes a duas famílias de alto risco biológico e social, previamente caracterizados por marcadores RAPD, foram estudados quanto à variabilidade genética de uma região do gene que codifica a enzima Beta-glicosiltransferase (*gtfB*). Os resultados revelaram transmissibilidade de isolados intrafamiliar e relação entre sorotipos e virulência. Visando estabelecer um método de detecção direta para *S. mutans*, uma sonda cadeado (*padlock*) RCA foi desenvolvida a partir de sequências intergênicas 16S-23S rDNA de *S. mutans*, e associada ao método de amplificação isotérmica do DNA total em círculos rolantes (RCA). A sonda foi testada em diferentes amostras de DNA, incluindo isolados *S. mutans* procedentes de indivíduos com diferentes históricos da doença, linhagens referência do gênero, além de amostras de biofilme dental e saliva. O método demonstrou ser efetivo para a detecção de *S. mutans*, apresentando alta especificidade em relação a outras espécies do grupo mutans.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; cárie; RAPD; região intergênica; *gtfB*; RCA; sonda padlock.

ABSTRACT

Dental caries is an infectious disease that can be greatly affected by the endogenous and exogenous conditions within each individual host. The main etiological disease - related agent is the bacterium *Streptococcus mutans*, due to its virulence factors such as ability to adhere to the tooth's enamel and lead to biofilm formation, through the production of extracellular polysaccharides. Exopolysaccharides, which are glucans synthesized from the enzyme Glucosyltransferases, promote the accumulation of microorganisms at specific sites on dental surfaces and become enzymatically active when exposed to dietary sucrose. In this context, the aim of this study was to characterize *S. mutans* through molecular markers, by using the partial sequencing of the *gtfB* gene and detect the microorganism using probe-based RCA methodology. In this work, genomic DNA from *Streptococcus* bacteria was isolated through two methods of extraction using cetyltrimethylammonium bromide detergent (CTAB). The composite method that used ultrasound was the most efficient, allowing the straightforward extraction of genomic DNA from Gram-positive bacteria with good quality and reproducibility. In order to characterize the genetic variability of various *S. mutans* isolates and to correlate this variability with different colonization profiles observed during dental caries in a sample of children, *S. mutans* samples were isolated from saliva of children with several histories of dental caries. Initially selected by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers, they were characterized by sequencing a specific region of the gene encoding the enzyme beta-glucosyltransferase (*gtfB*). The results indicated the existence of genetic variability that could be related to the virulence pattern, thus justifying the variations observed in the levels of colonization of individuals and clinical manifestation of the disease. The specific aim was identifying the intrafamilial transmission of salivary isolates of *S. mutans* in individuals belonging to two families with high biological and social risk. Initially characterized by RAPD markers, those *S. mutans* were characterized by genetic variability of a specific region of the gene encoding the enzyme beta-glucosyltransferase (*gtfB*). The results revealed the transmissibility among isolates within families and relationship between serotypes and virulence. Aiming to establish a direct detection method for *S. mutants*, a padlock-RCA (*Rolling circle amplification*) probe was developed from the sequence analysis of intergenic 16S-23S rDNA of *S. mutans*, associated with the isothermal method of Rolling Circle Amplification (RCA) of the total DNA. The probe was tested in different samples of DNA, including isolates of *S. mutans* proceeding from individuals with different disease history, reference strains of the genus, beyond biofilm and saliva samples. The method was effective for detection of *S. mutans* isolates, with high specificity in relation to other species of mutans group.

Key words: *Streptococcus mutans*; caries; RAPD; intergenic region; *gtfB*; RCA; padlock probe.

INTRODUÇÃO

Muitos avanços em termos de tratamento e reabilitação de doenças bucais como cárie, doença periodontal, câncer, má formação dentária e traumatismos têm sido descritos pela literatura e incorporados nas rotinas e práticas ambulatoriais e cirúrgicas. Muito se tem pesquisado na busca de um consenso em termos de diagnóstico molecular para prevenção destas doenças. O desenvolvimento tecnológico, visando aprimorar equipamentos e pesquisas que auxiliem na descoberta de novos medicamentos e técnicas com objetivo de prevenção ou tratamento de doenças, consome em todo o mundo grande quantidade de recursos financeiros anualmente (WHO, 2011). Parte dos avanços se deve à interligação entre a biomedicina e a informática. O resultado desta combinação são ferramentas cada vez mais precisas e rápidas, que abrem maior espaço para a democratização da ciência e dos seus benefícios para a sociedade. Uma das áreas que tem se valido em grande escala da combinação entre a biologia, medicina e a informática é a biotecnologia: ciência que une conhecimentos em genética, biologia celular e molecular, engenharia química, robótica, tecnologia da informação e bioética, entre outros. Os avanços tecnológicos nestas áreas têm fornecido à medicina um potencial antes dificilmente imaginado. Com custos acessíveis e menor tempo, a precisão dos resultados é ainda mais importante quando se trata de informação obtida através de análise de milhões de elementos, como é o caso de genes e suas combinações. Através do sequenciamento do DNA é possível conhecer características genéticas de um organismo, além de diagnosticar e tratar doenças previamente (WURMEISTER, 2011). Com a popularização dessa tecnologia será possível personalizar ainda mais os tratamentos.

No caso da cárie dental, que acomete a grande maioria da população, em diferentes faixas etárias, sem distinção de gênero, classe social ou etnia, é mundialmente estudada como uma doença infecciosa multifatorial, cujo principal agente etiológico é o *Streptococcus mutans*. Este micorganismo é o precursor do biofilme dental, com propriedades de aderência ao esmalte dental e produção de ácidos a partir do consumo de carboidratos na dieta do hospedeiro

(EMANUELSSON; THORNQVIST, 2001; BEIGHTON, 2005; LEME *et al.*, 2006; ISLAM *et al.*, 2007; BOWEN ; KOO, 2011; CRIELAARD *et al.*, 2011).

No Brasil, verificam-se muitos avanços na prevenção, visando controlar a doença cárie em crianças, contudo, a situação de adolescentes, adultos e idosos ainda está distante de ser considerada ideal, pois existe um grande volume de necessidade de tratamento acumulado durante décadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012). Entendendo a necessidade de mudar este contexto, o Ministério da Saúde vem criando políticas públicas que reúnem uma série de ações em saúde bucal, voltadas para cidadãos de todas as idades, priorizando famílias de menor poder aquisitivo, entendidas como de risco social. Desta forma, o controle da doença nas famílias deve abordar aspectos microbiológicos, fisiológicos, imunológicos, sociais e culturais. A multifatorialidade da doença explica tal complexidade, sendo o fator microbiológico mundialmente pesquisado dentro das famílias (CAUFIELD *et al.*, 1988; EMANUELSSON *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2000; EMANUELSSON; THORNQVIST, 2001; KOHLER *et al.*, 2003; CORBY *et al.*, 2007).

Métodos tradicionais de predição de risco e prevenção, não têm sido suficientes para elucidar completamente, questões específicas a respeito da manifestação clínica da doença como, por exemplo, virulência do agente causal, suscetibilidade do hospedeiro e transmissibilidade. Desta forma, a cárie é a mais prevalente e dispendiosa doença infecciosa bucal, sendo considerada uma pandemia. É evidente que novas abordagens são necessárias, associando a microbiologia, imunologia e biologia molecular, para controlar os componentes de comunidades microbianas do biofilme dental. A utilização crescente de sequenciamento de DNA para a caracterização de agentes patogênicos, comensais e ecossistemas complexos, tais como o microbioma bucal, vem conduzindo novas abordagens no estudo das interações parasita-hospedeiro, como exemplo o uso de técnicas moleculares utilizando primers e sondas de DNA.

Sendo assim, parte-se da hipótese que os indivíduos são colonizados por diferentes biosorotipos de *S. mutans*, possibilitando assim a formação do biofilme dental em indivíduos independente da manifestação clínica da doença, evidenciando a existência de microrganismos com diferentes potenciais de virulência, os quais estão associados a variações nos padrões de expressão da doença cárie.

OBJETIVO GERAL

Dentro deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi detectar e caracterizar variabilidade genética associada à transmissibilidade e potencial de virulência de isolados de *S. mutans* por meio de marcadores moleculares, utilizando marcadores RAPD, sequenciamento parcial do gene *gtfB* e aplicação de sonda espécie específica baseada na metodologia RCA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma metodologia de extração de DNA para bactérias do gênero *Streptococcus*;
- Avaliar a variabilidade genética de *S. mutans* em amostras salivares de crianças através do sequenciamento parcial do gene *gtfB*, e comparar as sequências nucleotídicas, identificando regiões específicas;
- Identificar a transmissibilidade intrafamiliar em isolados de *S. mutans* com maior similaridade genética, previamente analisada por meio de marcadores RAPD, utilizando sequenciamento parcial do gene *gtfB*;
- Desenvolver a sonda espécie-específica em cadeado (Padlock) associada à técnica de amplificação do DNA em círculo rolante RCA (*Rollig Circle Amplification*) para detecção de *S. mutans*.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

A cárie dental é uma doença infecciosa, com a dinâmica do biofilme dental, dieta e fatores endógenos do hospedeiro causando modificações na atividade da doença. O principal fator biológico associado à doença é o biofilme dental firmemente aderido na superfície dental. A formação da matriz rica em exopolissacarídeos, a acidificação do meio bucal através da ingestão frequente da sacarose e consequente persistência do pH baixo na interface dente-biofilme são os maiores fatores controláveis de virulência, os quais modulam a patogênese da cárie dental (JEON *et al.*, 2011).

A colonização inicial do biofilme dental depende da aderência, sinalização, adaptação nutricional e modulação do hospedeiro. Na comunidade da placa dental estão presentes mais de 100 diferentes tipos de bactérias. Interações de adesão e metabólicas ocorrem entre as células bacterianas. A aderência e colonização pelo *S. mutans* são dependentes de processos complexos em vários níveis, os quais definem o sucesso ou fracasso do microrganismo no ecossistema humano (AHN *et al.*, 2008). A presença universal de estreptococos em humanos (e em muitos outros animais hospedeiros) reflete o sucesso dessas estratégias. Paradoxalmente, os pontos fortes dos mecanismos de colonização de estreptococos também podem ser os pontos fracos que a serem explorados para o desenvolvimento de novas formas de controle da colonização e infecção.

Para Ferjeskov e Nyvad (2003), a cárie dental é uma doença complexa, causada por um desequilíbrio fisiológico entre minerais do dente e o fluido do biofilme. Entretanto, a cárie pertence ao grupo de doenças complexas ou multifatoriais como o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes, nas quais fatores de risco genéticos do hospedeiro, biológicos do agente etiológico, ambientais e comportamentais interagem (FERJESKOV, 2004). O grande desafio hoje é descobrir como estes fatores contributivos interagem, no sentido de traduzir isto em estratégias efetivas para diagnóstico da doença, prevenção e terapia. Para tanto, deve-se ter em mente que a cárie é ubíqua em todas as populações, mas a sua incidência apresenta variações inter e intra populacionais. Desta forma, a cárie deve ser controlada por intervenções múltiplas, durante toda

a vida, visando manter uma dentição funcional. E, todo tratamento restaurador deve ser acompanhado pelo controle individual dos níveis da doença simultaneamente. Para Islam *et al.* (2007), mudança na homeostase bucal que favorece a extensa colonização pelo *S. mutans*, é reconhecida na maioria das vezes como a causa primária da doença.

Estudos demonstram que *S. mutans* está associado com a cárie em seres humanos e que há uma correlação entre a concentração salivar desta bactéria e o risco de desenvolvimento da doença (BRATTHALL, 1992; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; BEIGHTON, 2005). Sabe-se que em pacientes com alta atividade de cárie, a concentração de *S. mutans* na saliva é frequentemente elevada. Tal concentração varia de hospedeiro para hospedeiro, sendo as condições endógenas do mesmo, responsáveis por estes níveis (CARLSSON *et al.*, 1985). Vários fatores relacionados à ecologia bucal são atribuídos a condições que favorecem o estabelecimento e multiplicação de *S. mutans* na boca. As características genéticas do hospedeiro, associadas à microbiota bucal, estão entre as mais relevantes (BARBIERI, 2005). Desta forma, *S. mutans* é amplamente distribuído, não apenas em populações de moderada ou alta incidência de cárie, como também em populações que não apresentam ou têm baixo índice da doença, indicando que a simples colonização por esta bactéria não implica no desenvolvimento da cárie dental (BEIGHTON, 2005).

O microrganismo *S. mutans* tem sido o mais relacionado à cárie, pois durante o seu processo evolutivo desenvolveu características fisiológicas e morfológicas que determinaram a sua cariogenicidade ou virulência (KLEIN *et al.*, 2004). Além de possuir várias estruturas que facilitam sua aderência, como glicocálice e fímbrias, *S. mutans* apresenta enzimas, como a glicosiltransferase e a frutossiltransferase, capazes de converter moléculas de açúcares, como a sacarose, em polímeros extracelulares, responsáveis pela aderência desse microrganismo às superfícies dentárias e agregação com outros microrganismos presentes na boca resultando no biofilme dental. Segundo Koo *et al.* (2010), *S. mutans* é o contribuinte chave na formação da matriz polissacarídica extracelular nos biofilmes dentais, sendo os exopolissacarídeos que provém sítios de união para promover o acúmulo de microrganismos na superfície dental e posterior estabelecimento do biofilme patogênico.

Como a microbiota bucal está intimamente relacionada com a saúde bucal, é geralmente aceito que uma mudança na composição microbiana é um passo importante para a progressão da doença bucal. Existe estudo que atualmente tem demonstrado esta mudança ecológica (CRIELAARD *et al.*, 2011).

Segundo Leme *et al.* (2006), a cárie dental é uma doença bucal dependente do biofilme e os carboidratos fermentáveis da dieta são a chave dos fatores ambientais envolvidos na sua iniciação e desenvolvimento. Entretanto, entre os carboidratos, a sacarose é considerada o mais cariogênica, porque, além de ser fermentada por bactéria bucal, ela é substrato para a síntese de polissacarídeos extra e intracelulares.

Com relação aos fatores dietéticos, o mais relevante é o fato que a sacarose é o único substrato a partir do qual são produzidos polissacarídeos extra-celulares (PEC) por estreptococos do grupo mutans, sendo que os PEC insolúveis em água (glucanos) são importantes para a colonização e acúmulos destas bactérias nas superfícies dentárias (TANZER, 1992; HAJISHENGALLIS; MICHALEK, 1999). Observa-se assim, que *S. mutans* desenvolve-se bem em meio ácido e tem requerimento nutricional simples, mas isto não pode ser o determinante primário para sua colonização. A produção de polissacarídeos a partir da sacarose pode facilitar a colonização de superfícies lisas dos dentes por *S. mutans*. Mas esta colonização parece ser uma consequência tardia da colonização inicial de fóssulas e fissuras, pois a bactéria requer uma superfície não escovada ou limpa para sua colonização. Os mecanismos precisos da colonização e do acúmulo nas superfícies dentárias ainda vêm sendo esclarecidos.

Duas fases distintas, aparentemente independentes, parecem caracterizar a colonização dos dentes. A fase primária ou inicial da colonização é dependente da interação específica de proteínas da película adquirida do esmalte com moléculas de superfície da célula bacteriana, denominadas adesinas. A segunda fase de colonização é denominada fase de acúmulo e propicia o aumento do número de células bacterianas na placa dental, sendo importante para a produção de ácidos, o que favorece os processos de desmineralização dental. O acúmulo de *S. mutans* nas superfícies dentárias envolve diferentes processos de interação, co-aderência e co-agregação com outros microrganismos bucais (KOLENBRANDER; LONDON, 1993).

Estudos da distribuição intrafamiliar de *S. mutans*, visando esclarecer sua possível aquisição e rota de transmissão em humanos, têm sido propostos por vários autores com resultados diversos. Alguns indicam que a mãe é a maior fonte de infecção (CAUFIELD *et al.*, 1988; CAUFIELD; WALKER, 1989; CAUFIELD *et al.*, 1993; LI; CAUFIELD, 1995; LI *et al.*, 2000; THORILD *et al.*, 2003, NAKAI *et al.*, 2010), outros sugerem a possibilidade de transmissão e aquisição em adultos (MASUDA *et al.*, 1985; BOWDEN; HAMILTON, 1998; OKADA *et al.*, 2002, NIE *et al.*, 2002), outros demonstrando o papel do pai na rota de transmissão (EMANUELSSON *et al.*, 1998; EMANUELSSON; WANG, 1998, KOZAI *et al.*, 1999), e também a fonte de transmissão da bactéria fora da família (JORDAN; VAN HOUTE, 1985; MATTOS-GRANER *et al.*, 2001; TEDJO SANSONSKO; KOZAI, 2002; KLEIN *et al.*, 2004; DOMEJEAN *et al.*, 2010).

Porém, novos estudos são necessários, buscando uma melhor caracterização da transmissibilidade deste microrganismo dentro do núcleo familiar e social estudado, com correlação de fatores de risco microbiológico como quantificação de *S. mutans* e caracterização de sua virulência; associados à epidemiologia da doença.

O termo virulência é descrito como a capacidade de um microrganismo causar doença em um hospedeiro. A relação entre hospedeiro e microrganismo é dinâmica, dependente de suas características individuais e do inter-relacionamento com fatores externos. A virulência de uma bactéria consiste em propriedades que promovem sua entrada, colonização e crescimento no hospedeiro. Dentre os estreptococos do grupo mutans, *S. mutans* é considerado o de maior relevância devido seus fatores de virulência, e vem sendo descrito há muitos anos como agente etiológico da cárie dental (HAMADA, 1986; LOESCHE, 1986).

Segundo Jeon *et al.* (2011), a doença cárie pode ser reduzida pelo controle da população de *S. mutans* no biofilme dental, pelo aumento da resistência ácida do dente e controle da composição de carboidratos da dieta. Métodos mecânicos de remoção de placa bacteriana controlam e são efetivos para reduzir apenas temporariamente o principal agente etiológico da doença, *S. mutans*. O controle químico com terapia baseada em clorexidine, bem como vacinas (enzimas) aplicadas nos dentes, tem sido pouco eficaz. O aumento da resistência do dente

tem sido verificado com a incorporação do flúor ao esmalte dental, através da fluoretação da água de abastecimento público e dentifrícios fluoretados. A substituição dietética da sacarose também é pouco promissora. Ainda segundo Jeon *et al.* (2011), a maior parte dos estudos envolvendo produtos naturais tem sido focadas nos efeitos gerais inibitórios da síntese de glucanos, bem como no metabolismo e crescimento bacteriano.

A importância das glicosiltransferases de *S. mutans* e da matriz polissacarídica extracelular é enfatizada por Koo *et al.* (2010) no desenvolvimento de micro-colônias altamente estáveis e estruturadas e sua influência na biomassa, arquitetura e patogenicidade de biofilmes de multi-espécies. A produção de glucanos (GtfB e GtfC) atuando de forma associada, em diferentes sítios, pode potencializar a habilidade da bactéria *S. mutans* em competir com outras espécies bucais e permitir a persistência em altos níveis na superfície do esmalte por período prolongado de tempo. Claramente as mudanças de conformação e reação das glicosiltransferases nas superfícies são complexas e modulam a patogenia das cáries dentais "*in situ*", merecendo investigações mais profundas (BOWEN; KOO, 2011).

Através destas enzimas, que são associadas ao microrganismo, *S. mutans* utiliza a sacarose como substrato, separando-a em glicose e frutose, e por fermentação clássica produz energia e grande quantidade de ácido lático. O pH ácido, proveniente do aumento da concentração do íon hidrogênio, causa saturação do cálcio e do fosfato na fase fluida ao redor do dente, ocasionando o processo de desmineralização dos tecidos dentários. Este pH é um dos responsáveis pela instalação de uma comunidade microbiana acidúrica e acidogênica no biofilme bacteriano dental (PINTO, 2008).

Algumas moléculas de glicose provenientes da sacarose são também convertidas em polissacarídeo intracelular de alto peso molecular (amilopectina ou glicogênio), este processo proporciona armazenamento de material para o metabolismo energético quando nenhum substrato exógeno for encontrado. Além disso, *S. mutans* pode produzir hidrolases glicosídicas que extraem hidratos de carbono da saliva para utilização como fonte de energia (GRÖNROOS; ALALUUSUA, 2000). Desta forma, maiores estudos são necessários para avaliar a relação entre variações nos genes *gtf* e a capacidade de síntese de glucanos

insolúveis, habilidade de colonização e acúmulo nas superfícies dentárias, bem como sua influência na cariogenicidade de clones específicos, buscando identificar marcadores moleculares para diagnóstico individual e epidemiológico.

A identificação genética de *S. mutans* que é considerado o principal microrganismo cariogênico indígena da boca e principal agente etiológico da cárie dental, é essencial para estudos da diversidade e transmissibilidade entre humanos (MOSER *et al.*, 2010). Segundo Kreth *et al.* (2005), a superfície da mucosa humana é colonizada por um grande número de espécies bacterianas, assim chamadas de flora indígena. Em um estado de homeostase, esta flora indígena tem um papel importante na proteção do hospedeiro contra invasão por patógenos exógenos, entretanto, quando a homeostase é rompida, a flora indígena pode causar doenças, como a cárie dental e doença periodontal. *S. mutans* é um dos muitos membros da biota oral indígena relacionado com a cárie severa precoce na infância (*Severe Early Childhood Caries* - S-ECC). Devido à maioria dos humanos abrigarem *S. mutans*, mas nem todos manifestarem a doença, tem sido proposto que linhagens de *S. mutans* associadas com S-ECC são geneticamente distintas daquelas encontradas em crianças livres de cárie (SAXENA *et al.*, 2008).

A variabilidade genética de microrganismos pode ser detectada por análise do fenótipo ou por marcadores moleculares. A primeira, considerada clássica, baseia-se na caracterização morfológica ou bioquímica, restringindo os estudos em populações. As técnicas moleculares, por sua vez, fornecem ferramentas para evidenciar diversos aspectos relacionados diretamente ou indiretamente ao DNA. Desta forma, a análise dos ácidos nucleicos vem sendo amplamente utilizada na diferenciação de indivíduos e no esclarecimento filogenético dos organismos.

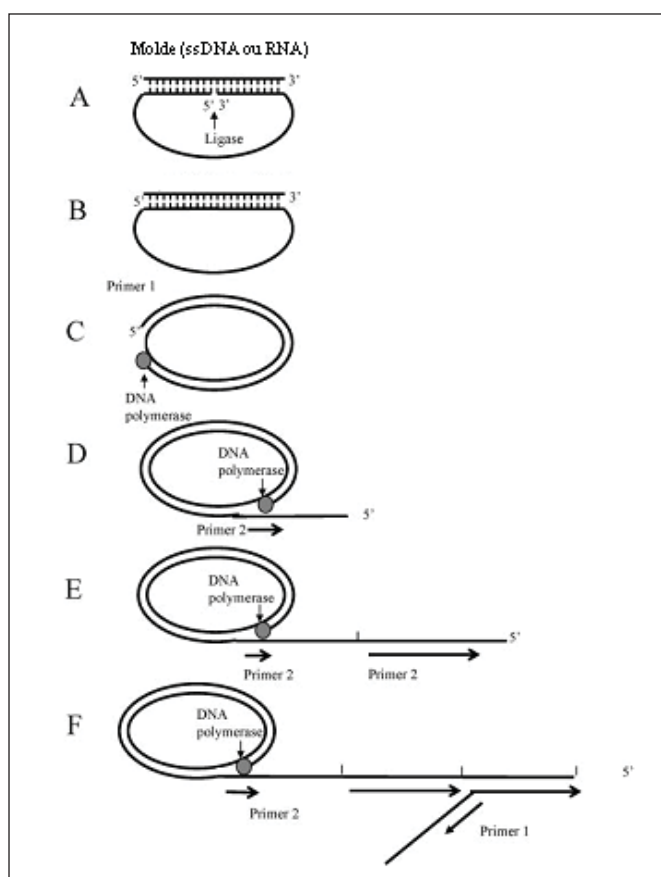
Desde que muitas espécies pertencentes ao gênero *Streptococcus* estão sendo associadas a várias condições patológicas, diferentes protocolos tem sido usados para sua identificação precisa, a qual ainda é laboriosa. Laboratórios clínicos usam agrupamentos sorológicos, reações hemolíticas e testes fenotípicos; entretanto estas sorologias não são espécie-específicas, e a atividade hemolítica difere dentro da espécie e depende de procedimentos de incubação. Isolados dentro de uma espécie podem diferenciar-se em um traço comum, e também a mesma linhagem pode exibir variabilidade bioquímica (LAL *et al.*, 2011). Além de testes bioquímicos, testes imunológicos e métodos genéticos têm sido usados para diferenciá-los.

Devido à sua alta especificidade e sensibilidade, a reação em cadeia da polimerase (PCR) está sendo correntemente aplicada em larga escala em diagnóstico e pesquisa. Os marcadores baseados na sequência do gene 16S rDNA, o qual é conservado e não está sujeito a mudanças devido às condições de cultivo, nem exibem variabilidade bioquímica, têm sido propostos para serem aplicados em qualquer isolado bacteriano bucal, devido a sua relação custo e efetividade. O sequenciamento é uma maneira rápida de identificação dos isolados em ágar Mittis Salivarius e também pode ser usado para diferenciar isolados que são difíceis de distinguir devido aos seus traços muito próximos e características bioquímicas (LAL *et al.*, 2011).

Segundo Hassan *et al.* (2003), o espaço intergênico ribossomal, um segmento de DNA que encontra-se entre a subunidade do gene 16S e 23S rRNA, provou ser mais variável que os genes ribossomais 16S e 23S adjacentes, sugerindo que este segmento de DNA poderia estar sob uma pressão seletiva mínima, comparada aos genes rRNA, permitindo assim uma diferenciação entre linhagens dentro de espécie, ou a identificação da espécie devido a forte variação entre espécies dentro do gênero. Para Tung *et al.* (2007), a utilização de sequências intergênicas 16S-23S fornece uma abordagem útil para a identificação deste patógeno, em uma plataforma molecular, ao lado de sequências do gene 16S rDNA.

Com a diversidade de bactérias associadas à doença cárie, é possível que diferentes genótipos de *S. mutans* possam exercer efeito seletivo na manifestação clínica da doença. O conceito de diversidade, aqui abordado, compreende a diversidade apresentada abaixo do nível de espécie, também chamada de diversidade intra-específica (SCHLOTTER *et al.*, 2000), pela qual são avaliadas estirpes pertencentes à mesma espécie. Para o estudo da diversidade intra-específica, geralmente são utilizadas técnicas de impressão digital com alta resolução. Isso se deve, em parte, à impossibilidade do uso de métodos tradicionais da microbiologia e à dificuldade de se construir iniciadores e sondas estirpe-específicas, em razão da pequena variabilidade entre as sequências de nucleotídeos (LUDWING; SCHLEIFER, 1994). Vários fatores podem influenciar a diversidade intra-específica, entre eles, a separação espacial, diferenças ambientais e interações bactéria-hospedeiro (SCHLOTTER *et al.*, 2000).

Em 1994, Nilson *et al.* desenvolveram sondas de oligonucleotídeos que são úteis para a detecção localizada de ácidos nucleicos específicos, para aplicação em *Rolling Circle Amplification* (RCA). Esta sonda cadeado (*padlock*) é um oligonucleotídeo circularizável, que consiste de dois segmentos complementares terminais a região 3' e 5' da sequência alvo, através de uma região genética vinculadora. Quando as regiões terminais 3' e 5' dos oligonucleotídeos da sonda são justapostos à sequência de interesse, os finais da sonda podem ser ligados pela ação de uma DNA ligase para formar uma molécula de DNA circular que pode ser amplificada por RCA (Figura 1).



Fonte: Wang *et al.*, 2005

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO RCA

(A) Sonda *Padlock* (cadeado) é desenhada contendo segmento de hibridização complementar a sequência alvo de DNA ou RNA; (B) A sonda cadeado pode ser circularizada pela ação de uma DNA ligase; (C) Sonda é ligada, e a ligação de oligonucleotídeo iniciador complementar (primer 1) para a RCA é catalisada por uma DNA polimerase de deslocamento vertente; (D) São realizadas repetições em série de sequências complementares à sonda circular que foram gerados por RCA. O oligonucleotídeo iniciador reverso (primer 2) liga-se a cada repetição múltipla gerada pelo círculo rolante; (E) Múltiplos eventos de ligação são iniciados pelo oligonucleotídeo iniciador 2 (primer 2) enquanto o RCA inicial vertente se alonga; (F) Uma vez que estes eventos de ligação são alongados, e geram fitas de DNA deslocadas, novos sítios de ligação para o primeiro oligonucleotídeo iniciador (primer 1) são gerados. Assim, na presença de um molde circular, os dois oligonucleotídeos iniciadores geram um padrão de autopropagação, crescente, de alternância de eventos de deslocamento da cadeia, ramificação e de lançamento de fragmentos de DNA.

O Círculo Rolante de Amplificação (*Rolling Circle Amplification* - RCA) que foi proposto nos anos 90 (FIRE; XU, 1995) é uma técnica isotermal de amplificação de DNA sensível, específica e reprodutível, para uma identificação molecular rápida de microrganismos (NAJAFZADEH *et al.*, 2011). Os diagnósticos baseados no RCA são caracterizados pela boa reprodutibilidade, com menos erros de amplificação comparados a PCR (DEMIDOV, 2002). Esta técnica permite a detecção de uma única alteração nucleotídica e previne uma amplificação não específica, um fator de risco comum na PCR convencional. Desta forma, a amplificação pela técnica RCA é particularmente útil para discriminar espécies proximamente relacionadas ou genótipos dentro da mesma espécie (SUN *et al.*, 2010).

Em estudos de rotas de transmissão da cárie e na detecção de linhagens mais virulentas do *S. mutans*, existe a necessidade de marcadores moleculares mais sensíveis e específicos como, por exemplo, sondas específicas associadas ao método RCA de amplificação, que apresentem condições de aplicabilidade prática com boa relação custo/ eficiência. Portanto, marcadores moleculares são de suma importância para a elucidação da etiologia da doença cárie e dos diversos fatores microbianos envolvidos na transmissão e colonização, os quais ainda não foram efetivamente descritos.

CAPÍTULO II

Variações metodológicas no isolamento do DNA genômico de bactérias do gênero *Streptococcus*

Methodological Variations in the Isolation of Genomic DNA from *Streptococcus* Bacteria

BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY

Vol.53, n. 4: pp. 845-849, July-August 2010

ISSN 1516-8913 Printed in Brazil

Autores

Mônica Moreira¹, Juliana Noschang¹, Ivana Froede Neiva¹, Yanê Carvalho², Ilma Hiroko Higuti¹ and Vânia Aparecida Vicente^{1*}

¹ *Departamento de Patologia Básica; Universidade Federal do Paraná; Curitiba - PR - Brasil.*

² *Laboratório de Parasitologia Molecular; Universidade Federal do Paraná; Curitiba - PR – Brasil*

***Autor correspondente:** vicente@ufpr.br Setor de Ciências Biológicas / C.P. 19020 CEP 81.531-980, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil
Fone: 55 41 3361.1697 Fax: 55 41 3266.2042- Site: <http://patologia.bio.ufpr>

Resumo

Neste trabalho, o DNA genômico de *Streptococcus pyogenes*, *S. mutans* e *S. sobrinus* foi isolado utilizando dois métodos: um usando o detergente brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) a 65°C; o outro com aplicação de ultrassom a uma mistura de sílica e celite ao CTAB. O método que utilizou ultrassom foi mais eficiente, permitindo correta extração do DNA genômico de bactérias Gram-positivas com boa qualidade e reprodutibilidade.

Palavras-chave: *Streptococcus*, Isolamento de DNA, CTAB, ultrassom.

Introdução

Os estreptococos piogênicos pertencem aos grupos A, C e G de Lancefield. São agentes patogênicos de uma variedade de doenças humanas e animais (BERT *et al.*, 1997). O *Streptococcus pyogenes* (Estreptococo β -hemolítico do grupo A – GAS) é responsável por causar doenças como erisipelas, faringotonsilites e escarlatina (GONZALEZ *et al.*, 2003), e alguns sorotipos estão associados com complicações como a glomerulonefrite pós estreptocócica e febre reumática (EDWARDS *et al.*, 2003). Os *Streptococcus mutans* são considerados os principais agentes etiológicos da cárie dental. Este grupo de microrganismos compreende sete espécies distintas, incluindo *S. mutans* e *S. sobrinus*, os quais estão mais comumente associados às doenças humanas (HAMADA e SLADE, 1980; LOESCHE, 1986).

Avanços em biologia molecular têm proporcionado técnicas baseadas em PCR (Reação de Cadeia de Polimerase) e sequenciamentos que permitem aprimorar o diagnóstico e monitoramento de doenças causadas por microrganismos, além de estudos epidemiológicos e de transmissibilidade. O DNA bacteriano pode ser amplificado por PCR e posteriormente sequenciado para fornecer a identificação bacteriana. Um método eficiente de extração de DNA que resulta em pureza, é fundamental para o sucesso da PCR e o subsequente sequenciamento do DNA (SMITH *et al.*, 2003), assim como outras reações utilizadas em biologia molecular. A demanda para diagnósticos moleculares na medicina e microbiologia bucal ressalta a necessidade de métodos eficientes de extração de DNA.

Com finalidade de aplicação em práticas de laboratório, o processo de extração de DNA deve preferencialmente ser de baixo custo, seguro, simples, capaz de ser reproduzido e adequado às amostras estudadas. A parede celular das bactérias Gram-positivas podem ser rompidas pelo uso de enzimas que degradam peptideoglicanos como a lisozima e a mutanolisina presente em *kits* comerciais (YANO *et al.*, 2002; OLD *et al.*, 2006), os quais encarecem o procedimento. A utilização de métodos alternativos de menor custo nem sempre são apropriadas devido à dificuldade de rompimento da parede celular quando alguns reagentes são utilizados, como o fenol-éter (RANTAKOKKO-JALAVA; JALAVA, 2002). Nesse sentido o DNA bacteriano pode ser extraído a partir de soro por fervura sem o uso de reagentes tóxicos, substituindo o uso de *kits* comerciais de alto custo para purificação de DNA (MAYORAL *et al.*, 2005). Alguns pesquisadores já têm utilizado brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) com bons resultados e considerável redução de custo (DOYLE; DOYLE, 1987; PETERSEN; SCHEIE, 2000; IGARASHI *et al.*, 2001), algumas vezes combinado com duodecil sulfato de sódio (DELLAPORTA *et al.*, 1983). Em 1956, estudos desenvolvidos por Slade e Vetter mostraram que métodos físicos como o uso de ultrassom ou agitação com pérolas de vidro facilitam o rompimento da parede celular.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia e aplicabilidade na rotina laboratorial de dois métodos para extração de DNA genômico de bactérias Gram-positivas, como *S. pyogenes*, *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Materiais e métodos

Amostras

Quarenta micorganismos isolados de *S. pyogenes* coletados de orofaringe de trabalhadores de uma empresa de alimentos processados, na cidade de Curitiba, estado do Paraná, acometidos por um surto de faringite estreptocócica ocorrida em 2004, e 64 isolados de estreptococos do grupo Mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) obtidos de amostras salivares de 40 indivíduos pertencentes a 9 famílias de baixa renda residentes na região metropolitana de Curitiba, Paraná. Todos os isolados de estreptococos foram cultivados em Infusão de Cérebro e

Coração (BHI), incubados a 37°C por 24 horas. As culturas obtidas tinham aproximadamente 10^8 células, de acordo com escala McFarland.

Extração total de DNA

1. Protocolo usando CTAB segundo Petersen e Scheie (2000), modificado.

As culturas foram centrifugadas a 49000g por 2 min, e o sobrenadante foi descartado. As células bacterianas foram lavadas duas vezes usando tampão TRIS-EDTA (TE). O volume de 600µL de CTAB foi adicionado ao precipitado e mantido em banho-maria a 65°C por 30 min. Após, adicionou-se 800µL de solução ácida de clorofórmio álcool isoamílico (CIA, 24:1, v/v), a mistura foi centrifugada a 49000g por 7 min. Um total de 450µL do sobrenadante foi removido e transferido para outro frasco no qual foram adicionados mais 450µL de CIA, e a solução homogeneizada. Em seguida centrifugaram-se os frascos a 49000g por 7 min. e 300µL do sobrenadante foram transferidos para outro frasco, ao qual foram adicionadas 2,5 partes de etanol 96% gelado. Os frascos foram deixados durante uma noite a -20°C. A etapa final foi repetida com etanol 70% gelado, a mistura foi centrifugada 49000 g por 7 min. Os frascos foram levados a um fluxo laminar onde foram abertos com objetivo de secagem do precipitado. O DNA foi então suspenso em 50µL de água ultra pura e armazenado a -4°C.

2. Protocolo usando ultrassom combinado com sílica e celite em CTAB, segundo De Hoog *et al.* (2004) modificado

As amostras foram previamente cultivadas em caldo BHI por 24 horas a 36°C. Após, as amostras foram centrifugadas a 49000 g por 2 min. E o precipitado transferido para outro frasco contendo uma mistura de sílica em pó (sílica gel Merck) e celite (2:1) para maceração em 600µL de tampão CTAB. Foram aplicados três pulsos de 30 seg. de ultrassom (potência 70) com intervalos de 30 seg. entre cada pulso. Este procedimento foi realizado mantendo-se os frascos em gelo e o equipamento de ultrassom Unique®. Em seguida, 400µL de CTAB foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 min. Após atingir a temperatura ambiente, 1000µL de solução CIA foram adicionadas à mistura a qual foi centrifugada a 49000 g por 7 min. O sobrenadante foi transferido para outro frasco, no qual foram adicionados 1000µL

de CIA e novamente centrifugado. Aproximadamente 2000µL de etanol 96% gelado foram adicionados ao sobrenadante e o frasco incubado a -20°C durante uma noite para a precipitação dos ácidos nucleicos. Após este período, o frasco foi centrifugado a 49000 g por 7 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol gelado 70% e centrifugado a 49000 g por 7 min. O etanol foi em seguida removido e os frascos mantidos abertos em fluxo laminar até a secagem completa do precipitado, após o mesmo foi ressuscitado em 50µL de água ultra pura e deixados em temperatura ambiente por 24 horas, sendo após este período armazenados a -4°C.

Análise da extração de DNA

O DNA extraído foi quantificado usando espectrofotometria (260nm), e sua integridade foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, seguida de marcação com brometo de etídio e visualização em luz UV.

Resultados e discussão

Os resultados indicaram que a eficácia da extração de DNA de *S. pyogenes*, assim como as das outras espécies do grupo mutans (*S. mutans* e *S. sobrinus*) foi muito diferente. O método usando CTAB a 65°C resultou na extração de DNA genômico de apenas uma amostra de *S. pyogenes* e 24 amostras dos isolados do grupo mutans (2,5% e 37,9% respectivamente). Contudo, o método que usou a combinação de sílica e celite em ultrassom permitiu 100% dos isolados de *S. pyogenes* e 91% dos isolados de estreptococos do grupo mutans (Figura 1). O método CTAB foi descrito para extrações de DNA de fungos e plantas e demonstrou êxito para estreptococos (PETERSEN; SCHEIE, 2000).

Apesar do sucesso de alguns pesquisadores no isolamento do DNA genômico de bactérias utilizando o método do CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987; PETERSEN; SCHEIE, 2000; IGARASHI *et al.*, 2001), a ação apenas deste detergente a 65°C não foi eficiente para romper a parede celular das três espécies de estreptococos testadas no presente estudo. Entretanto o protocolo combinando o uso de ultrassom com sílica e celite adicionados ao CTAB foi muito mais efetivo na extração do DNA genômico dessas espécies de estreptococos

Gram-positivos. O uso do ultrassom aumentou consideravelmente a eficácia do rompimento da parede celular, devido à exposição à oscilação sônica da suspensão contendo células de estreptococos causando o rompimento da parede celular e a consequente liberação do conteúdo intracelular (SLADE; VETER, 1956).

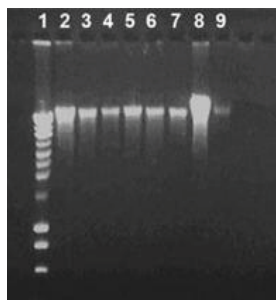


Figura 1 – Extração do DNA a partir de isolados de *Streptococcus*: 1 – Marcador molecular de 100pb, 2,3,4 – *S. pyogenes* (300ng,150ng,100ng, respectivamente) 5,6,7 – *S. mutans* (200ng, 150ng, 150ng respectivamente); 8,9 – *S. sobrinus* (500ng, 50ng, respectivamente)

O DNA obtido por utilização de método físico da maceração com sílica-gel junto com ultrassom representou uma alternativa metodológica, na qual a quantidade e a qualidade do material extraído foram suficientes para RAPD, PCR e sequenciamento (Figura 2).

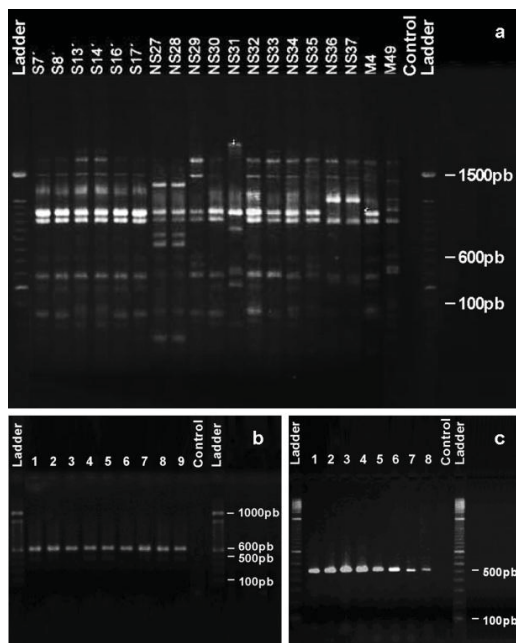


Figura 2 – Gel de agarose representativo da amplificação do DNA genômico bacteriano, obtido pelo método de ultrassom em associação com a mistura de sílica e celite em CTAB: a) Perfil de amplificação do DNA polimórfico (RAPD) de *Streptococcus* do Grupo A (GAS); b) Perfil de amplificação da região IGS obtido do DNA genômico de isolados de *S. mutans* (1-9) c) Reação de sequenciamento do gene da glicosiltransferase (*gtfB*) de isolados de *S. mutans* (1-8)

Este estudo demonstrou que a detecção molecular de bactérias com parede celular resistente em amostras clínicas poderia ser reforçada pelo uso de métodos físicos de desintegração da parede celular como relatado por outros autores (RANTAKOKKO-JALAVA; JALAVA, 2002). Os resultados também indicaram que nenhum método isolado foi ótimo para a detecção de todas as bactérias que possam estar presentes nos fluidos biológicos, e o uso de mais de um método deveria ser recomendado.

Métodos simplificados de extração de DNA para estreptococos do grupo A (GAS) têm sido propostos usando aquecimento e descongelamento em associação com o uso de mutanolisina (Sigma, St. Louis, Mo.) e hialuronidase (Sigma) (BEALL *et al.*, 1996; JOSE; BRAHMADATHAN, 2006). Ambos os métodos foram considerados eficientes pelo fato de que o DNA extraído foi utilizado em diferentes métodos moleculares de amplificação de DNA. Entretanto, os métodos que usam enzimas, apresentam um custo elevado em comparação com os métodos propostos no presente estudo.

A vantagem em usar o método físico como pré-tratamento sem aquecimento ou congelamento/descongelamento, e sem o uso posterior de enzimas, está na simplicidade e baixo custo. Além de ser útil à padronização desses métodos para extrações simples e rápidas de DNA diretamente das colônias isoladas de linhagens de GAS e estreptococos do grupo mutans cultivados em meios líquidos, facilitando estudos moleculares (MOREIRA *et al.*, 2007).

O presente estudo confirma a hipótese que o uso do método ultrassom com a associação de sílica e celite no CTAB teve boa reprodutibilidade, foi de simples execução, e permitiu extração de alta qualidade de DNA das células Gram-positivas, e assim poderia ser utilizado em laboratórios de biologia molecular.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Prof. Dr. Walter Boeger pelo suporte técnico.

Referências

1. BEALL, B.; FACKLAM, R.; THOMPSON, T. Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A *Streptococci*. **Journal of Clinical Microbiology**, n.4, v.34, p. 953-958, 1996.
2. BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing *pyogenic streptococci*. **Current Microbiology**, n. 34, p. 226-229, 1997.
3. DE HOOG, G.S.; ATTILI-ANGELIS, D; VICENTE, V. A.; VAN DEN ENDE, A. H.; Queiroz-Telles, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaeeae* species. **Medical Mycology**, n.5, p. 405-416, 2004.
4. DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J.B. A plant DNA miniprep: versão II. **Plant Molecular Biology Reporter**, n.1, p. 19-21, 1983.
5. DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, n.19, p.11-15, 1987.
6. EDWARDS, M. L.; FAGAN, P. K.; SMITH-VAUGHAN, H.; CURRIE, B. J.; SRIPRAKASH, K. S. Strains of *Streptococcus pyogenes* from severe invasive infections bind Hep2 and HaCaT cells more avidly than strains from uncomplicated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, n.41, p. 3936-3938, 2003.
7. GONZÁLEZ-REY, C.; BELIN, A. M.; JÖRBECK, H.; NORMAN, M.; KROVACEK, K.; HENRIQUES, B.; KÄLLENIUS, G.; SVENSON, S. B. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. **Comparative Immunology, Microbiology e Infection Diseases**, n. 26, p. 25-35, 2003.
8. HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Reviews**, n.44, p.331-384, 1980.
9. IGARASHI, T.; YANO, Y.; YAMAMOYO, A.; SASA, R.; GOTO, N. Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe. **Letters in Applied Microbiology**, n. 32, p. 394-397, 2001.
10. JOSE, J.J.M.; BRAHMADATHAN, K.N. Evaluation of simplified DNA extraction methods for *emm* typing of group A *Streptococci*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, n.24, v. 2, p.127-30, 2006.
11. LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, n.50, p. 353-380, 1986.

12. MAYORAL, C.; NOROÑA, M.; BARONI, M.R.; GIANI, R.; ZALAZAR, F. Evaluation of a nested-PCR assay for *Streptococcus pneumoniae* detection in pediatric patients with community-acquired pneumonia. **Revista Argentina de Microbiología**, n. 37, v.4, p. 184-188, 2005.
13. MOREIRA, M.; VICENTE, V. A.; GLIENKE, C. Genetic variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by RAPD markers. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.38, p. 729-735, 2007.
14. OLD, L.A.; LOWES, S.; RUSSEL, R.R.B. Genomic variation in *Streptococcus mutans*: deletions affecting the multiple pathways of β -glucoside metabolism. **Oral Microbiology and Immunology**, n.21, p. 21-27, 2006.
15. PETERSEN, F.C.; SCHEIE, A.A. Genetic transformation in *Streptococcus mutans* requires a peptide secretion-like apparatus. **Oral Microbiology and Immunology**, n. 15, p. 329-334, 2000.
16. RANTAKOKKO-JALAVA, K.; JALAVA, J. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, n.40, p.4211-4217, 2002.
17. SLADE, H. D.; VETTER, J. K. Studies on *Streptococcus pyogenes*. I. Observations on the microscopical and biological aspects of the disintegration and solubilization of a type 6 strain by shaking with glass beads. **Journal of Bacteriology**, n.71, p.236-243, 1956.
18. SMITH, K.; DIGGLE, M. A.; CLARKE, S. C. Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, n.41, p. 2440-2443, 2003.
19. YANO, A.; KANEKO, N.; HIROSHIDA, I.; TOSHIKAZU, Y.; HANADA, N. Real time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, n.217, p. 23-30, 2002.

CAPÍTULO III

Marcadores moleculares na avaliação da variabilidade de *Streptococcus mutans* e o risco biológico à cárie na infância

Autores

Moreira, M¹; Neiva, IF¹; Klisiowicz, DR²; Souza, RLR³; Vicente, VA^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR.

² Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da UFPR.

³ Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR.

****Autor correspondente:** vicente@ufpr.br

Setor de Ciências Biológicas / C.P. 19020

CEP 81.531-980 Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Tel: 55 41 3361.1697 Fax: 55 41 3266.2042

Site: <http://patologia.bio.ufpr>

Resumo

Neste trabalho, amostras de *S. mutans* isoladas da saliva de trinta crianças que apresentavam distintos históricos de cárie foram identificadas por meio de marcadores morfológicos, bioquímicos, e sequências intergênicas (16S-23S) do rDNA. A variabilidade genética dos isolados foi inicialmente detectada através de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), com diferenciação dos isolados utilizando o sequenciamento de regiões específicas do gene que codifica a enzima Beta-glicosiltransferase (*gtfB*). O objetivo deste trabalho foi identificar a variabilidade genética de *S. mutans* e a relação com o perfil de colonização e epidemiologia da doença cárie na infância. Os marcadores RAPD revelaram variabilidade, indicando agrupamentos entre os isolados, demonstrando uma relação entre procedência de *S. mutans* e histórico clínico da doença. A partir do sequenciamento da região intergênica, verificou-se que os isolados pertenciam à espécie *S. mutans*. Por meio da similaridade genética dos isolados e padrão de variação aminoacídica a partir do sequenciamento parcial do gene *gtfB*, foram demonstradas diferenças nas bases nucleotídicas, sugerindo que tais alterações podem influenciar o padrão de virulência dos isolados, justificando assim, as variações observadas nos níveis de colonização dos indivíduos e manifestação clínica da cárie.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*; cárie; RAPD; região intergênica; *gtfB*.

Introdução

A cárie é uma doença infecciosa e transmissível, de origem microbiana, associada à presença bacteriana na colonização de superfícies dentais (CAUFIELD *et al.*, 2000, TANZER *et al.*, 2001; BERKOWITZ, 2006). Devido a sua natureza multifatorial e origem microbiana, pode variar de intensidade e prevalência de acordo com as condições endógenas de cada hospedeiro (TINANOFF *et al.*, 2002; BARBIERE *et al.*, 2007; PHATTARATARATIP *et al.*, 2011).

Muitos estudos têm demonstrado que *S. mutans* está associado à presença da cárie em seres humanos, onde o risco ao desenvolvimento desta doença está na maioria das vezes diretamente relacionado ao número destes microrganismos presentes na saliva, e a dieta do indivíduo (TINANOFF *et al.*, 2002; GUDKINA; BRINKMANE, 2010). Segundo Koo *et al.* (2010), *S. mutans* é o contribuinte chave para a formação da matriz extracelular polissacarídica nos

biofilmes dentais. Os exopolissacarídeos, que são glucanos sintetizados a partir da glicosiltransferase, promovem sítios de acumulação de microrganismos na superfície dental, e são enzimaticamente ativos quando expostos à sacarose da dieta.

Entretanto, observa-se que *S. mutans* é amplamente distribuído não apenas em populações de moderada a alta incidência de cárie (BEIGTON, 2005), como também em populações que não apresentam ou têm baixo índice da doença (MATEE *et al.*, 1993), mostrando que a simples colonização por estes microrganismos não implica no desenvolvimento da cárie (BEIGTON, 2005). Uma possível explicação para sua presença em indivíduos com baixa experiência de cárie é que fatores de virulência da bactéria (KILIAN *et al.*, 1998) e os fatores endógenos do hospedeiro podem diferir entre as populações.

O *S. mutans* é um dos muitos membros da biota bucal indígena, relacionado com a cárie severa precoce na infância “Severe Early Childhood Caries” (S-ECC). Devido à maioria dos humanos abrigarem *S. mutans*, mas nem todos manifestarem a doença, tem sido proposto que linhagens de *S. mutans* associadas com S-ECC são geneticamente distintas daquelas encontradas em crianças livres de cárie (SAXENA *et al.*, 2008).

Marcadores moleculares têm esclarecido a variabilidade genética existente entre isolados de *S. mutans* provenientes da saliva e de outras fontes. Dentre eles, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido amplamente utilizado (SPOLIDORIO *et al.*, 2003; MOREIRA *et al.*, 2007; DOMEJEAN *et al.*, 2010). Sequências IGS (regiões intergênicas 16S - 23S) têm sido utilizadas para identificar *Streptococcus* como membros de uma espécie ou grupo, ou classificá-los em novas espécies. O sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima Beta-glicositransferase tem sido utilizado para avaliar a sua atividade enzimática, verificando, assim, a sua virulência (FUJIWARA *et al.*, 1998; HOSHINO *et al.*, 2004).

Neste trabalho, amostras de *S. mutans* isoladas da saliva de crianças que apresentavam diferentes históricos de cárie foram identificadas por meio de marcadores morfológicos, bioquímicos, sequências IGS (16S-23S) e marcadores RAPD; com posterior diferenciação dos isolados por meio de sequenciamento de regiões específicas do gene *gtfB*, visando identificar a variabilidade genética e a relação destes com o perfil de colonização na população infantil investigada.

Materiais e métodos

Casuística e isolados estudados

Para o estudo foram selecionados 44 isolados de *S. mutans*, obtidos a partir de coletas salivares de 30 crianças procedentes de escolas rurais assistidas pelo Projeto de Extensão Universitária, intitulado “Estratégia multidisciplinar na prevenção e controle de doenças de manifestação clínica na infância” (VICENTE *et al.*, 2011). A população infantil, com diferentes perfis epidemiológicos da doença cárie, foi inicialmente investigada por meio do índice CPO-D (Número de Dentes Permanentes Cariados, Perdidos e Obturados) e ceo-d (dentes decíduos). O consumo de sacarose foi avaliado através da frequência e quantidade de ingestão diária; o isolamento e a estimativa de UFC/mL de saliva (Unidades Formadoras de Colônia) foi realizada em Ágar Mittis Salivarius (GOLD *et al.*, 1973). A partir da caracterização bioquímica, os 44 isolados de *S. mutans* foram divididos em 3 grupos, segundo fatores identificados durante a anamnese e exame clínico (Tabela 1).

Este protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná (UFPR), CEP/SD 085.SI 048/04-06. Um consentimento por escrito foi obtido dos responsáveis pelas crianças envolvidas neste estudo.

Tabela 1 – Isolados de *S. mutans* utilizados neste estudo, segundo grupos de avaliação clínica

Grupo Clínico	Fatores	Isolado	Criança	Idade	CPOD	ceo	Cárie ativa
Grupo I	↑[Sacarose]	SM01	A	5	0	4	Sim
	↑UFC/mL	SM02	B	5	0	5	Sim
	↑Cárie	SM03	C	8	0	6	Sim
		SM04	D	6	0	6	Sim
		SM05	E	12	4	--	Sim
		SM06	F	8	0	2	Não
		SM07	G	4	0	5	Sim
		SM08	H(1)	11	12	--	Sim
		SM09	H (2)	11	12	--	Sim
		SM10	I	6	0	4	Sim
		SM11	J(1)	7	0	5	Sim
		SM12	J(2)	7	0	5	Sim
		SM13	J(3)	7	0	5	Sim
		SM14	K(1)	6	4	5	Sim
		SM15	K(2)	6	4	5	Sim
		SM16	L(1)	10	1	7	Sim
		SM17	L(2)	10	1	7	Sim
		SM18	M	7	1	4	Sim
Grupo II	↑[Sacarose]	SM19	N	6	2	4	Não
	↓UFC/mL	SM20	O(1)	11	4	--	Sim
	↑Cárie	SM21	O(2)	11	4	--	Sim
		SM22	P	8	0	2	Não
		SM23	Q	6	0	4	Sim
		SM24	R	6	0	5	Sim
		SM25	S(1)	6	0	6	Sim
		SM26	S(2)	4	0	6	Sim
		SM27	T	4	0	2	Sim
		SM28	U	7	2	3	Sim
Grupo III	↑[Sacarose]	SM29	V(1)	10	0	--	Não
	↓UFC/mL	SM30	V(2)	10	0	--	Não
	↓Cárie	SM31	W(1)	5	--	0	Não
		SM32	W(2)	5	--	0	Não
		SM33	X(1)	7	--	0	Não
		SM34	X(2)	7	--	0	Não
		SM35	X(3)	7	--	0	Não
		SM36	Y(1)	6	--	0	Não
		SM37	Y(2)	6	--	0	Não
		SM38	Z	11	0	--	Não
		SM39	α	12	0	--	Não
		SM40	e(1)	9	0	1	Não
		SM41	e(2)	9	0	1	Não
		SM42	€(1)	7	0	1	Não
		SM43	€(2)	7	0	1	Não
		SM44	¥	11	2	--	Não

Legenda: De 0 a 100 UFC/mL (↓UFC) e acima de 100000 UFC/mL (↑UFC); ↑ [Sacarose] = alta concentração de açúcar na dieta; ↑ ou ↓ Cárie = maior ou menor histórico a doença cárie (CPOD + ceo); A até ¥ corresponde a diferentes crianças analisadas

Extração de DNA e RAPD

A extração de DNA foi realizada de acordo com Moreira *et al.* (2010), utilizando CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) sob ultra-som associado à sílica e celite (2:1). Para as reações de RAPD foram utilizados seis oligonucleotídeos iniciadores: OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3'), OPA 3 (5' AGTCAGCCAC 3'), OPA 5 (5' AGGGGTCTTG 3'), OPA 8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA 9 (5' GGGTAACGCC 3') , OPA 13 (5' CAGCACCCAC 3') (MOREIRA *et al.*, 2007). A reação de PCR foi montada de acordo com as condições descritas por Moreira *et al.* (2007). Incluiu-se em todas as amplificações como referência, as linhagens de *S. mutans* ATCC 25175 e UA159, e como grupo externo linhagem de *S. sobrinus* ATCC 33478 e de *S. pyogenes* ATCC 13540. Os produtos resultantes da amplificação por RAPD foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,6%. A análise do polimorfismo foi verificada pelo método de UPGMA (MEYER, 1993), utilizando coeficiente de similaridade de Jaccard por meio do programa NTSYS, versão 2.1 (ROHLF, 2000). A consistência dos agrupamentos foi verificada por *bootstrap* (FELSENSTEIN 1986-1993), obtido com 10.000 re-amostragens, utilizando o software Bood 3.03 (COELHO, 2005), sendo considerados consistentes os agrupamentos que apresentaram “p” maior ou igual a 75%.

Amplificação e sequenciamento da região intergênica (16S-23S) e parcial do gene *gtfB*
O DNA total dos isolados de *S. mutans* foi submetido à amplificação da região intergênica utilizando os primers 13BF (5'-GTGAATACGTTCCCGGGCCT-3') e 6R (5'-GGGTTYCCCCRTTCRGAAAT-3') (CHEN *et al.*, 2004). Para sequenciamento do gene *gtfB*, foram utilizados os primers GTFB-F (5' ACTTACACACTTTTCGGGTGGCTTGG 3') e GTFB-R (5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC 3') de acordo com Oho *et al.* (2000).

As reações de sequenciamento segundo Murphy *et al.* (2005), consistiram de 50 ng dos produtos de PCR purificado com PEG (polietilenoglicol), 125 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,5 µL do Big-Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing Kit, para 0,5 µL de tampão; dois primers em igual concentração de 50 nM, a completar um volume final de 10 µL a reação com água ultra pura. As reações de amplificação consistiam de 1 min a 96°C seguido de 35 ciclos a 96°C por 10 s em 50°C por 5 s e por 60°C por 4min para extensão final. Após liofilização em *SpeedVac* a 60°C por 40 min,

as amostras foram sequenciadas por eletroforese em ABI 377 (*Applied Biosystems*). As sequências foram analisadas e corrigidas com o programa STADEN PACKAGE (STADEN; JUDGE; BONFIELD, 2001) e alinhadas com a versão do CLUSTAL-W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Para a obtenção da composição nucleotídica e aminoacídica, cálculo das distâncias e posições nucleotídicas variáveis foi utilizado o programa MEGA 3 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).

Resultados e discussão

Entre as 30 crianças analisadas (Tabela 1), 13 apresentavam uma alta concentração de *S. mutans* na saliva (acima de 10^5 UFC/mL) e alto histórico da doença (CPO-D e ceo), enquanto que 17 crianças apresentavam em torno de 10^2 UFC/mL e a maioria tinha um baixo histórico da doença, indicando uma relação positiva entre concentração de *S. mutans* na saliva e a manifestação clínica da doença. No entanto, entre as crianças com baixa colonização (Grupo II), observou-se um grupo com uma baixa concentração de *S. mutans* na saliva, e um alto histórico de cárie, sugerindo diferenças no padrão de virulência dos isolados.

De acordo com o perfil de amplificação por meio de marcadores RAPD verificou-se presença de polimorfismo entre os isolados estudados. A análise dos dados demonstrou a separação dos isolados em 7 grupos considerando valores de *bootstrap* acima de 75% (Tabela 2).

Tabela 2 – Agrupamentos dos isolados de *S. mutans* provenientes de amostras salivares de crianças gerados pelos marcadores RAPD

Isolados	Procedência	Grupo Clínico*	Bootstrap
SM1-SM3	Hospedeiros diferentes	Grupo I	80%
SM8-SM9	Mesmo hospedeiro	Grupo I	99%
SM11-SM12-SM13	Mesmo hospedeiro	Grupo I	83%
SM20-SM21	Mesmo hospedeiro	Grupo II	88%
SM32- SM33	Hospedeiros diferentes	Grupo III	80%
SM35- SM37	Irmãos	Grupo III	88%
SM39-SM41-SM42	Hospedeiros diferentes	Grupo III	75%

* Grupo clínico estabelecido a partir de dados epidemiológicos da doença, concentração de *S. mutans* na saliva e consumo de sacarose (Tabela 1)

De acordo com o polimorfismo gerado pelos marcadores RAPD, inicialmente uma relação foi verificada entre grupos genéticos de *S. mutans* e dados epidemiológicos da doença (Tabela 2). Neste estudo foram utilizadas as linhagens referência de *S. mutans* ATCC 25175, procedente da National Collection of Type Cultures (NCTC) – UK, e UA159, procedente da Universidade Alabama Birmingham - EUA, as quais formaram agrupamentos separados dos isolados estudados. A ocorrência de agrupamentos de isolados procedentes de indivíduos diferentes, suportados por alto valor de *bootstrap*, indicou a possibilidade de transmissibilidade de *S. mutans* entre escolares. Tais resultados vem de encontro com o anteriormente relatado por Domejean *et al.* (2010), que utilizando *primers* arbitrários, verificaram a presença de genótipos correspondentes de *S. mutans*, comprovando a existência de transmissibilidade horizontal do microrganismo entre escolares de 5 a 6 anos. Além disso, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, foram verificados dois agrupamentos de isolados procedentes de mesmo indivíduo (SM 11-12-13 e SM 20-21).

Tais resultados (Tabela 2) indicaram a existência de diversidade entre os isolados, relacionada com os padrões de variação da manifestação clínica da doença, sugerindo ainda, que cada indivíduo pode ter um padrão diferenciado de colonização pelo *S. mutans*, o que pode estar associado às características endógenas do hospedeiro, uma vez que estes indivíduos apresentavam uma dieta comum caracterizada pela alta ingestão de sacarose (Tabela 1).

Segundo Kreth *et al.* (2005), a superfície da mucosa humana é colonizada por um grande número de espécies bacterianas, em um estado de homeostase, a qual tem um papel importante na proteção do hospedeiro contra invasões por patógenos exógenos. Entretanto, quando a homeostase é rompida, a flora indígena pode causar doenças, como a cárie dental e doença periodontal. A alta colonização e o aumento do número de genótipos pode provavelmente ser uma consequência da frequência de consumo de carboidratos fermentáveis, e é possível que ações simultâneas de diferentes genótipos com potencial cariogênico distinto possam aumentar o risco ao desenvolvimento da cárie dentária (ALALUUSUA *et al.*, 1996). Além do que, Crielaard *et al.* (2011), explorando a microbiota bucal de crianças, conseguiram demonstrar que a

microbiota salivar de crianças na idade de 3 a 18 anos está ainda em processo de maturação, podendo haver multicolonização nesta faixa etária.

Sendo assim, isolados dos diferentes grupos genéticos estabelecidos por meio dos marcadores RAPD foram caracterizados pelo sequenciamento de regiões intergênicas (16S-23S) do DNA ribossomal, com confirmação da identidade molecular dos isolados de *S. mutans*. A partir das sequências analisadas, verificou-se a existência de variabilidade entre os isolados avaliados. Os isolados SM1, SM2, SM6, SM12 e SM37 apresentaram maior similaridade genética entre si (Figura 1). Os isolados SM1 e SM12 (Grupo I, Tabela1) que apresentaram 100% de similaridade eram procedentes de diferentes crianças, sugerindo assim, a existência de transmissibilidade da bactéria *S. mutans* entre estes escolares (Figura 1). Constatando-se assim que a variabilidade entre os isolados, detectada por meio do sequenciamento da região IGS (Figura 1), não está relacionada com a virulência, mas pode indicar o caminho da transmissibilidade.

A linhagem ATCC de *S. sobrinus* utilizada como grupo externo neste estudo, agrupou-se distante das amostras em estudo.

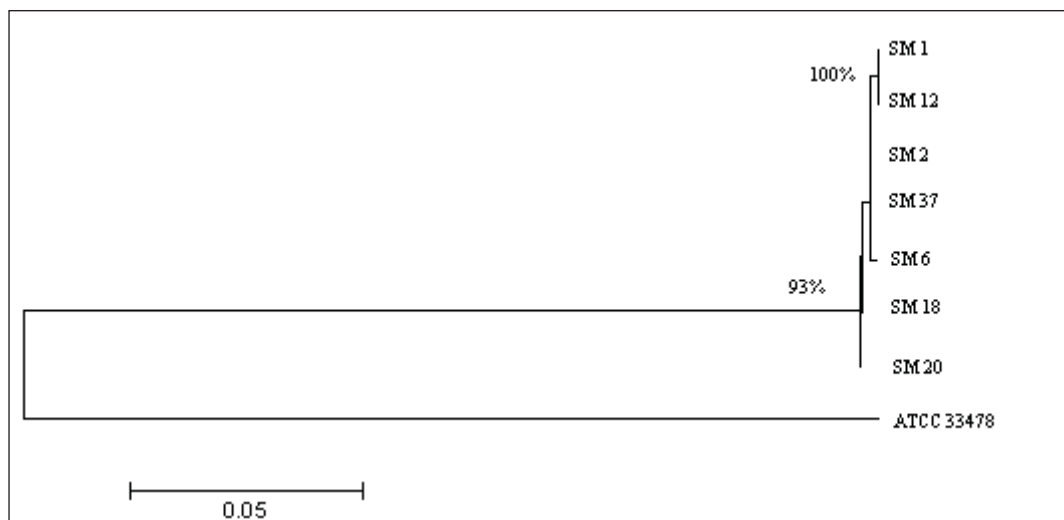


Figura 1 – Padrão de agrupamento obtido a partir do sequenciamento da região IGS de isolados de *S. mutans* (SM1 a SM37) e linhagem de referência ATCC 33478 de *S. sobrinus*. A árvore foi construída pelo método Neighbor-Joinig (Kimura 2-parâmetros)

A caracterização dos isolados por meio de sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima *gtfB* também foi realizada. De acordo com a literatura (KOO *et al.*, 2010; BOWEN; KOO, 2011) esta enzima parece estar diretamente

associada à aderência do microrganismo ao esmalte dental. A partir do sequenciamento parcial do gene que codifica a Beta-glicosiltransferase, foram identificados cinco diferentes genótipos entre os isolados analisados. As diferenças nas sequências nucleotídicas refletiam em variações aminoacídicas, as quais poderiam justificar as diferenças no padrão de virulência dos isolados. Na Figura 2, pode se observar isolados procedentes de crianças com diferentes históricos da doença, agrupados a partir da similaridade genética identificada pelo sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima *gtfB*.

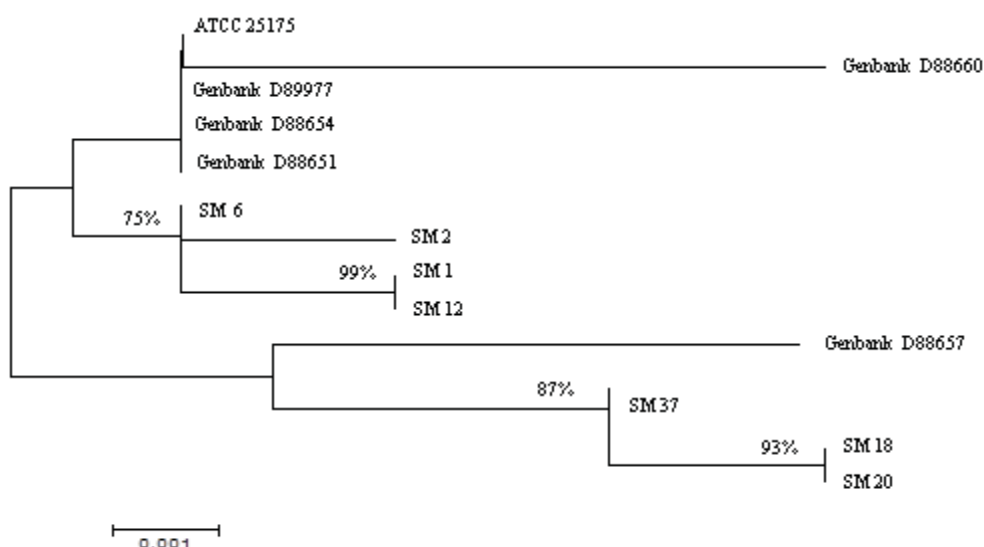


Figura 2 – Sequenciamento parcial do gene que codifica a enzima Beta-glicosiltransferase de *S. mutans*. Árvore construída pelo método Neighbor-Joinig (Kimura-2-parâmetros). ATCC 25175 linhagem referência de *S. mutans* utilizada; SM1 a SM37 isolados *S. mutans*; D88651 a D89977 sequências nucleotídicas da região GTF-B de *S. mutans* depositadas no GenBank

De acordo com a Figura 2, verificou-se que os isolados SM1, SM2, SM6 e SM12 provenientes de indivíduos com o mesmo histórico da doença (Tabela 1), foram reunidos em um mesmo grupo. Os isolados SM1 e SM12 eram idênticos quanto às sequências analisadas, apesar de serem provenientes de indivíduos distintos, porém com o mesmo padrão de manifestação clínica da doença, ou seja, alto histórico de cárie (Tabela 1). Tais resultados sugerem que os isolados apresentam um potencial de virulência similar.

A similaridade genética dos isolados SM20 e SM18, procedentes de indivíduos com diferentes padrões de colonização, evidenciados pela diferença na

estimativa de UFC/mL de saliva (Grupo Clínico I e II, Tabela 1), e alta prevalência da doença, também sugere uma similaridade no padrão de virulência destes isolados. O isolado SM37, procedente de criança com baixa concentração de *S. mutans* na saliva e sem histórico de cárie (Grupo Clínico III, Tabela 1), esteve agrupado com os anteriores, indicando que fatores endógenos e exógenos do hospedeiro também podem influenciar no desenvolvimento da doença.

Os isolados analisados apresentaram variações nas sequências dos aminoácidos as quais foram comparadas com sequências das linhagens referência utilizadas, previamente descritas por Fujiwara *et al.* em 1998. A linhagem D88657 (FUJIWARA *et al.*, 1998) agrupou-se com os isolados SM18, SM20 e SM37, na Figura 2, os quais apresentavam um padrão semelhante quanto à composição aminoacídica na posição 36 (Tabela 3).

Tabela 3 – Diferenças aminoacídicas para o gene *gtfB* entre os isolados de *S. mutans* e as linhagens referências utilizadas

		Posição										
Isolados		30	36	46	54	57	68	110	120	121	136	141
	1	S	A	Q	S	S	S	T	N	I	K	-
	2	S	L	.	-
	6	L	.	Y
	12	-
	18	.	V	.	.	.	N	A	.	L	.	-
	20	.	V	.	.	.	N	A	.	L	.	-
	37	.	V	.	.	.	N	.	.	L	.	-
Linhagem <i>S. mutans</i> (25175) ATCC		L	.	-
Fujiwara <i>et al.</i> , 1998	D89977	L	.	-
	D88660	.	.	P	.	F	.	.	.	L	N	-
	D88657	T	V	.	I	L	.	-
	D88654	L	.	-
	D886511	L	.	-

Legenda: . nucleotídeos semelhante, - inserção/deleção

A partir dos resultados apresentados na tabela 3, verificou-se que as posições aminoacídicas de 30 a 141 foram passíveis de variações do gene *gtfB* de *S. mutans*.

De acordo com a literatura, a existência de polimorfismo nos genes *gtfs* expressos por diferentes linhagens de *S. mutans* (CHIA *et al.*, 1991; YAMASHITA *et al.*, 1992) poderia estar associada às variações na atividade enzimática específica (CHIA *et al.*, 1991). Alterações de um único aminoácido dentro do domínio catalítico das GTFS provocadas por mutagênese sítio-dirigida são

capazes de alterar sensivelmente a atividade enzimática promovendo diferenças no padrão de aderência em superfície dental entre as linhagens de *S. mutans* estudadas (CHIA *et al.*, 1998).

Sendo assim, é importante ressaltar que o isolado 6 apresentou na posição aminoacídica 141 a inserção do aminoácido Tirosina, diferindo das demais (Tabela 1). Esta modificação gerou uma variação aminoacídica, podendo influenciar na atividade da enzima, uma vez que existem relatos (CHIA *et al.*, 1998; FUJIWARA *et al.*, 2002), indicando que esta posição é considerada a mais conservada da GTF-B, justamente por se encontrar dentro do domínio catalítico. Tal resultado pode estar associado ao padrão de virulência do isolado, o qual foi obtido de um indivíduo com um histórico alto de manifestação clínica da doença.

É também reconhecido que glicosiltransferases produzidas pelo *S. mutans* desempenham um papel importante na expressão da virulência do biofilme dental. Glicosiltransferases adsorvidas ao esmalte, sintetizando glucanos “*in situ*”, promovem sítios de ávida colonização por microrganismos e uma matriz insolúvel para a placa bacteriana dental (BOWEN, 2011), o que pode favorecer o desenvolvimento da doença.

A existência de grupos associando crianças com alta manifestação clínica da doença e baixo índice de *S. mutans* na saliva, demonstrou que se deve considerar, além dos fatores endógenos e exógenos ao indivíduo, a existência de variação quanto à virulência entre os biotipos selvagens de *S. mutans*.

Neste estudo, verificou-se que o sequenciamento parcial do gene da enzima Beta-glicosiltransferase representa uma ferramenta importante na elucidação da virulência de *S. mutans*, uma vez que determinadas variações aminoacídicas podem justificar as diferenças no padrão de colonização destas linhagens, o que pode refletir no risco biológico ao desenvolvimento da cárie dental nestas crianças.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da UFPR, CAPES e Fundação Araucária.

Referências

1. ALALUUSUA, S.; MATTO, J.; GRONROOS, L.; INNILA, S.; TORKKO, H.; ASIKAINEM, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; SAARELA, M. Oral colonization by more than one clonal type of *Mutans streptococci* in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, n.41, p.167-73, 1996.
2. BARBIERE, D.S.V.; VICENTE, V.A.; FRAIZ, F.C.; LAVORANTI, O.J.; SVIDZINSKI, T.I.E.; PINHEIRO, R.L. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Braz J Microbiol**, n.38, p.624-631, 2007.
3. BEIGTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dent Oral Epidemiol**, n.33, p.248-255, 2005.
4. BERKOWITZ, R.J. *Mutans streptococci: acquisition and transmission*. **Paediatr Dent**, n.28, v.2, p.106-109. 2006.
5. BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, n.45, v.1, p.69-86, 2011.
6. CAUFIELD, P.W.; GRIFFEN, A.L. Dental caries: An infectious and transmissible disease. **Pediatr Clin North Am**, n. 47, v.5, p.1001-1019, 2000.
7. CHEN, C.C.; TENG, L.J.; CHANG, T.C. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. **J Clin Microbiol**, n.42, v.6, p.2651-7, 2004.
8. CHIA, J.S.; HSU, T.Y.; TENG, L.J.; CHEN, J.Y.; HAHN, L.J.; YANG, C.S. Glucosyltransferase gene polymorphism among *Streptococcus mutans* strains. **Infect Immun**, n.59, v.5, p.1656-60, 1991.
9. CHIA, J.S.; YANG, C.S.; CHEN, J.Y. Functional analyses of a conserved region in glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, n.66, v.10, p. 4797-803, 1998.
10. COELHO, A.S.G. **Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através de procedimento de bootstraps**. BOOD 3.03> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2005.
11. CRIELAARD, W.; ZAURA, E.; SCHULLER, A.A.; HUSE, S.M.; MONTIJN, R.C.; KEIJSER, B.J. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. **BMC Med Genomics**, n.4, p.22, 2011.

12. DOMEJEAN, S.; ZHAN, L.; DENBESTEN, P.K.; STAMPER, J.; BOYCE, W.T.; FEATHERSTONE, J.D. Horizontal transmission of Mutans streptococci in children. **J Dent Res**, n.89, p.51-55, 2010.
13. FELSENSTEIN, J. P. **Phylogeny Inference Package**, version 3.5c. DNAPARS-DNA Parsimony Program. Seattle distributed by the author department of Genetics, University of Washington (1986-1993).
14. FUJIWARA, T.; HOSHINO, T.; OOSHIMA, T.; HAMADA, S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. **J Dent Res**, n.81, v.2, p.109-113, 2002.
15. FUJIWARA, T.; TERAOKA, Y.; HOSHINO, T.; KAWABATA, S.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S.; KIMURA, S.; HAMADA, S. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiol Lett**, n.161, v.2, p.331-336, 1998.
16. GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch Oral Biol**, n.18, v.11, p.1357-1364, 1973.
17. GUDKINA, J.; BRINKMAN, A. The impact of salivary Mutans streptococci and sugar consumption on caries experience in 6-year olds and 12-year olds in Riga. **Stomatologija**, n.12, v.2, p.56-59, 2010.
18. HOSHINO, T.; KAWAGUCHI, M.; SHIMIZU, N.; HOSHINO, N.; OOSHIMA, T.; FUJIWARA, T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, n.48, v.3, p.195-199, 2004.
19. KILIAN, M. Clonal basis of bacterial virulence. In: Shapiro S, Guggenheim B, eds. **Oral Biology at the Turn of the Century: Misconceptions, truths, challenges, and Prospects**. Basel: S. Karger AG, p.131-142, 1998.
20. KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M.I.; JEON, J.G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **J Bacteriol**, n.192, v.12, p.3024-3032, 2010.
21. KRETH, J.; MERRIT, J.; SHI, W.; QI, F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus Sanguinis* in the dental biofilm. **J Bacteriol**, n.187, v.21, p.7193-7203, 2005.
22. KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform**, n.5, p.150-163, 2004.
23. MATEE, M.I.N.; MIKX, F.H.M.; DE SOET, J.S.; MASELLE, S.Y.; DE GRAFF, J.; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H. Mutans streptococci in caries-active and caries free infants in Tanzania. **Oral Microbial Immunol**, n.8, v.5, p.322-324, 1993.
24. MEYER, D. **Árvores evolutivas Humanas: Uma discussão sobre inferência filogenética**. Série Monografias, 1993, v.3.

25. MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA, I.F.; CARVALHO, Y.; HIGUTI, I.H.; VICENTE, V.A. Methodological Variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. **Braz Arch Biol Technol**, n.53, v.4, p.845-849, 2010.
26. MOREIRA, M.; VICENTE, V.A.; GLIENKE, C. Genetic Variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by RAPD markers. **Braz J Microbiol**, n. 38, v.4, p.729-735, 2007.
27. MURPHY, K.M.; BERG, K.D.; ESHLEMAN, J.R. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. **Clin Chem**, n.51, v.1, p.35-9, 2005.
28. OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M.; KOGA, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiol Immunol**, n. 15, v. 4, p. 258-62, 2000.
29. PHATTARATARATIP, E.; OLSON, B.; BROFFITT, B.; QIAN, F.; BROGDEN, K.A.; DRAKE, D.R.; LEVY, S.M.; BANAS, J.A. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. **Mol Oral Microbiol**, n.26, v.3, p.187-99, 2011.
30. ROHLF, F.J. **NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1**. Exeter Software, New York, 2000, 98p.
31. SAXENA, D.; CAUFIELD, P.W.; LI, Y.; BROWN, S.; SONG, J.; NORMAN, R. Genetic classification of severe early childhood caries by use of subtracted DNA fragments from *Streptococcus mutans*. **J Clin Microbiol**, n.6, v.9, p.2868-73, 2008.
32. SPOLIDORIO, D.M.P.; HOFLING, J.F.; PIZZOLITO, A.C.; ROSA, E.A.; NEGRINI, T.C.; SPOLIDORO, L.C. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. **Braz J Microbiol**, n.34, v.3, p.213-217, 2003.
33. STADEN, R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods Biochem Anal**, n.43, p.303-22, 2001.
34. TANZER, J.M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A.M. The microbiology of primary dental caries in humans. **J Dent Educ**, n. 65, v.10, p.1028-37, 2001.
35. THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, n.22, v.22, p.4673-4680, 1994.
36. TINANOFF, N.; KANELIS, M.J.; VARGAS, C.M. Dental caries in preschool children. **Pediatr Dent**, n.24, p.6, p.543-551, 2002.
37. VICENTE, V.A.; MOREIRA, M.; ZARDO, E.L.; BRAGA, S.F.; COSTA, A.O.; NEIVA, I.F.; FRAIZ, F.C.; HIGUTI, I.H.; ILG, E.M.; BOMPEIXE, E.P.; HIGUTI, S.T.M.; PINTO, J.V.T. Estratégia multidisciplinar na prevenção e controle de doenças de manifestação clínica na infância. **RGO**, n.59, v.4, p.591-597, 2011.

38. YAMASHITA, Y.; BOWEN, W.H.; KURAMITSUL, H.K. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain exhibiting polymorphism in the tandem *gtfB* and *gtfC* Genes. **Infect Immun**, n.60, v.4, p.1618-1624, 1992.

CAPÍTULO IV

Caracterização molecular por meio do sequenciamento do gene da Beta-glicosiltransferase em *Streptococcus mutans* isolados de famílias com alto risco à cárie dental

Autores

Mônica Moreira¹, Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri², Ivana Froede Neiva¹, Débora do Rocio Klisiowicz², Vânia Aparecida Vicente^{1,2*}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná,

² Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná

***Autor correspondente:** vicente@ufpr.br

Setor de Ciências Biológicas / C.P. 19020

CEP 81.531-980, Universidade Federal do Paraná,

Curitiba, PR, Brasil

tel: 55 41 3361.1697 Fax: 55 41 3266.2042- Site: <http://patologia.bio.ufpr>

Resumo

A cárie é uma doença infecciosa, determinada por diversos fatores endógenos e exógenos ao indivíduo. O principal agente etiológico relacionado à doença é a bactéria *Streptococcus mutans*, devido a fatores de virulência como a capacidade de aderir-se ao esmalte dental e propiciar a formação do biofilme dental, através da produção de polissacarídeos extracelulares. A transmissibilidade deste microrganismo pode ocorrer entre indivíduos, mais frequentemente dentro da própria família. O objetivo deste trabalho foi identificar variabilidade genética e transmissibilidade intrafamiliar de *S. mutans* através do sequenciamento parcial do gene da enzima Beta-glicosiltransferase (*gtfB*). Isolados salivares provenientes indivíduos de duas famílias de alto risco biológico e social, caracterizados previamente por marcadores RAPD e bioquímicos, foram avaliados por meio do sequenciamento da região IGS e do gene *gtfB*. Os resultados revelaram similaridade do gene responsável pela produção dos polissacarídeos extracelulares, entre os isolados intrafamiliares de indivíduos com maior atividade de cárie.

Palavras-chave: *Streptococcus mutans*, Beta-glicosiltransferase, cárie ativa, sequenciamento

Introdução

A cárie dental é uma doença infecciosa, multifatorial, transmissível e dependente do metabolismo de açúcares fermentáveis por microrganismos acidogênicos e acidúricos, capazes de formar biofilmes sobre as superfícies dentais (SELWITZ *et al.*, 2007). Esta doença, mundialmente prevalente, resulta da dissolução da matriz mineral do dente, pela ação de ácidos orgânicos, como o ácido láctico. Estes ácidos são produtos finais do metabolismo que são excretados por certa microbiota presente no biofilme dental, mais notavelmente pelo *Streptococcus mutans*, que é encontrado na boca e associado com cárie dental em humanos (TAUBMAN *et al.*, 2006).

A bactéria *S. mutans* é o elemento chave para a formação da matriz extracelular polissacarídica no biofilme dental, pois estes são em sua maioria glucanos sintetizados pelas glicosiltransferases estreptocócicas, provendo sítios de acúmulo de microrganismos na superfície dental e posteriormente estabelecimento de biofilmes patogênicos (KOO *et al.*, 2010; BOWEN; KOO, 2011). Esta bactéria produz pelo menos três glicosiltransferases, que são produtos dos genes *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*. A GTF-B sintetiza a maior parte do glucano

insolúvel, a GtfC sintetiza uma mistura de glucanos solúveis e insolúveis e a GtfD sintetiza predominantemente glucanos solúveis. Assim a glicosiltransferase produzida pelo *S. mutans* seria a enzima de virulência que estaria envolvida na colonização bucal deste patógeno, portanto poderia ser utilizada como um marcador para biotipos com diferentes padrões de colonização, bem como para a investigação da transmissibilidade deste microrganismo. Segundo Nakai *et al.* (2010) uma importante estratégia de prevenção da cárie na infância inclui medidas que interfiram na transmissão de *S. mutans* dentro da família. Moser *et al.* (2010), utilizando Repetitive Extragenic Palindromic PCR para estudar a diversidade e transmissão de *S. mutans*, revelou resultados que não suportaram a noção que a transmissão materna representa a primeira aquisição de *S. mutans* em crianças com cárie severa na infância, indicando a necessidade de marcadores mais robustos.

Neste trabalho, nove famílias selecionadas em relação ao risco social e biológico para o desenvolvimento da doença, atendidas pelo SUS (Sistema Único de Saúde) de Curitiba (MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, 2012), foram escolhidas para uma investigação da doença cárie, por meio do isolamento do *S. mutans* da saliva dos indivíduos de cada núcleo familiar para posterior caracterização molecular dos isolados. Os isolados com similaridade genética, procedentes de duas famílias, sugeriam um padrão de transmissibilidade intrafamiliar, a partir do marcador RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e foram submetidos ao sequenciamento parcial do gene da Beta-glicosiltransferase (*gtfB*), visando estabelecer um marcador eficiente na detecção da transmissibilidade e identificação de biosorotipos específicos.

Materiais e métodos

Linhagens estudadas

Para o estudo foram utilizados 16 isolados intrafamiliares com similaridade genética, identificados previamente por marcadores RAPD, a partir de 64 isolados de indivíduos pertencentes a nove famílias atendidas pelo SUS Curitiba, que possuíam alta atividade da doença cárie (MOREIRA *et al.*, 2007). Os isolados eram procedentes de indivíduos de duas famílias: a família A composta de mãe e filho e a família B de mãe, pai e cinco filhos (Tabela 1).

Tabela 1 – Casuística observada nos indivíduos das famílias avaliadas, através da análise epidemiológica e microbiológica

Isolados	Família	Indivíduo	Idade*	CPO-D	ceo	Presença biofilme	Cárie ativa	UFC/mL
1 e 2	FA	Mãe	37	32	--	--	--	2,2x10 ⁴
3 e 4	FA	Filho	13	9	--	++	Sim	9x10 ⁴
5 e 6	FB	Mãe	32	5	--	+++	Não	6x10 ⁴
7	FB	Pai	31	3	--	+++	Não	1,3x10 ⁵
8 e 9	FB	Filho 1	13	0	--	+	Não	1x10 ⁵
10	FB	Filho 2	8	0	2	+	Não	1,5x10 ⁵
11 e 12	FB	Filho 3	6	4	5	++	Sim	1,7x10 ⁵
13,14 e 15	FB	Filho 4	4	--	6	++	Sim	2x10 ⁴
16	FB	Filho 5	1**	--	--	--	--	2x10 ²

Legenda: FA – família A, FB – família B. *Idade em anos, **idade em meses. CPO-D (dentes permanentes cariados, perdidos por cárie e obturados), ceo (dentes decíduos cariados, extraídos por cárie e obturados). Presença de biofilme dental visível no terço cervical (+), no terço médio (++), e presença de biofilme dental mineralizado (+++). Presença de cárie ativa (dentina cariada amolecida e/ou mancha branca ativa, com desmineralização do esmalte dental), UFC/mL Unidades formadoras de Colônia, por mL de saliva

Para o estudo foram utilizadas linhagens referência e sequências apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Diferentes sorotipos de *S. mutans* selecionados do Genbank utilizados neste estudo

Linhagem	Sorotipo	Referência	Número acesso Genbank <i>Gtfβ</i>
MT4239	c	Fujiwara, Osaka, 1998	>gi 3130084
MT4251	f	Fujiwara, Osaka, 1998	>gi 3130091
MT4467	e	Fujiwara, Osaka, 1998	>gi 3130101
MT4245	e	Fujiwara, Osaka, 1998	>gi 3130077
MT8148	c	Fujiwara, Osaka, 1998	>gi 3130070
GS-5	c	Shiroza, Chicago, 1987	>gi 153639

Extração do DNA

A extração do DNA genômico foi realizada com a utilização do tampão CTAB (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide*), juntamente com uma mistura de 2:1 de sílica gel e celite sob sonicação de 3 pulsos de 30 s (MOREIRA *et al.*, 2010).

Reação de PCR

A reação de PCR inicial foi realizada segundo Nakano *et al.* (2007), com os oligonucleotídeos iniciadores 536f (5' - CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3') e 1050r (5'-CAC GAG CTG ACG ACA-3') (16S rRNA) para confirmar a espécie. A seguir, foi realizada reação de PCR segundo Oho *et al.* (2000), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores GTFB – F (5'- ACT TAC ACA CTT TTC GGG TGG CTT GG-3') e GTFB – R (5'- CAG TAT AAG CGC CAG TTT CAT C- 3') (Invitrogen Life Technologies).

Sequenciamento do DNA

A marcação do DNA para posterior sequenciamento foi realizada com o Kit BigDye TM. Para a reação utilizou-se 30ng de DNA previamente purificado, 1µL do Kit Premix Ready Reaction, 3 µL de tampão (*sequencing buffer 2,5X*), 5 pmol de cada iniciador correspondente e água ultra-pura para completar a reação de 10 µL. As reações de amplificação consistiram de 1 min a 96°C seguido de 35 ciclos a 96°C por 10 s em 50°C por 5 s e por 60°C por 4min para extensão final. Para purificação do produto marcado foi utilizado o isopropanol a 75%, seguido de etanol a 70%. Após liofilização em SpeedVac a 60°C por 40 min, as amostras foram inseridas em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems).

Alinhamento, reconstrução filogenética do DNA e análise molecular

As sequências foram analisadas e corrigidas com o programa STADEN Pakage (STADEN; JUDGE; BONFIELD, 2001) e alinhadas pelo programa MEGA, versão 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011) com a obtenção da composição nucleotídica, aminoacídica, cálculo das distâncias e posições

nucleotídicas variáveis e análises filogenéticas. As sequências dos isolados intra-familiares foram comparadas com sequências de diferentes sorotipos de *S. mutans*, previamente depositadas no Genbank (Tabela 2).

Resultados

Dezesseis isolados, provenientes de duas famílias, foram previamente caracterizados por meio de marcadores RAPD e apresentaram similaridade genética, sugerindo um padrão de transmissibilidade.

A identidade molecular dos isolados foi confirmada a partir do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, utilizando para a amplificação os primers 536f e 1050r. As sequências resultantes foram comparadas com a sequência da linhagem NBRC 13955 de *S. mutans*, registrada no Genbank. O padrão de substituição e taxas foram estimadas sob o modelo Kimura 2 parâmetros (1980). A discreta distribuição Gama foi usada para modelar as diferenças de taxas evolutivas entre locais (5 categorias, [+ G]). As médias das taxas evolutivas nessas categorias foram de 0,90, 0,96, 1,00, 1,04 e 1,10 substituições por posição. As frequências de nucleotídeos foram A = 25,00%, T / U = 25,00%, C = 25,00% e G = 25,00. A análise envolveu 453 posições no conjunto de dados. As análises evolutivas foram realizadas no programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011).

Os 16 isolados intrafamiliares de *S. mutans* também foram caracterizados pelo sequenciamento parcial da região que codifica a enzima Beta-glicosiltransferase, e as sequências depositadas no European Nucleotide Archive (Tabela 3).

Tabela 3- Número de acesso no European Nucleotide Archive, do sequenciamento parcial da enzima Beta-glicosiltransferase de isolados intrafamiliares de *S. mutans*

Isolado	Nomenclatura no estudo	Gene sequenciado	Número de acesso
<i>S. mutans</i>	Isolado 1 (FA)	<i>gtfB</i>	HE962158
<i>S. mutans</i>	Isolado 2 (FA)	<i>gtfB</i>	HE962159
<i>S. mutans</i>	Isolado 3 (FA)	<i>gtfB</i>	HE962160
<i>S. mutans</i>	Isolado 4 (FA)	<i>gtfB</i>	HE962161
<i>S. mutans</i>	Isolado 5 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962162
<i>S. mutans</i>	Isolado 6 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962163
<i>S. mutans</i>	Isolado 7 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962164
<i>S. mutans</i>	Isolado 8 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962165
<i>S. mutans</i>	Isolado 9 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962166
<i>S. mutans</i>	Isolado 10 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962167
<i>S. mutans</i>	Isolado 11 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962168
<i>S. mutans</i>	Isolado 12 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962169
<i>S. mutans</i>	Isolado 13 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962170
<i>S. mutans</i>	Isolado 14 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962171
<i>S. mutans</i>	Isolado 15 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962172
<i>S. mutans</i>	Isolado 16 (FB)	<i>gtfB</i>	HE962173

Fonte: EMBL Nucleotide Sequence Database

<http://www.ebi.ac.uk/ena/about/page.php?page=submissions>

O sequenciamento desta região mostrou divergências nucleotídicas, onde foram verificadas substituições de bases nucleotídicas do tipo transversões. A variabilidade genética dos isolados pode ser visualizada na figura 1, com a formação de agrupamentos a partir da similaridade genética dos isolados. De acordo com a figura 1, observou-se que no grupo I foram reunidos isolados da família B, os quais eram provenientes da mãe (isolado 16 FB) e filho (isolado 5 FB). No grupo II, agruparam-se dois isolados (8 e 9) provenientes do filho 1 da família B (FB). O agrupamento III foi formado por isolados provenientes de indivíduos da família B (FB). Além disso, observou-se no agrupamento IV, isolados provenientes de indivíduos das duas famílias (FA e FB). Neste agrupamento verificou-se a presença da linhagem referência 3130084 de *S. mutans* selecionada do Genbank, sorotipo c.

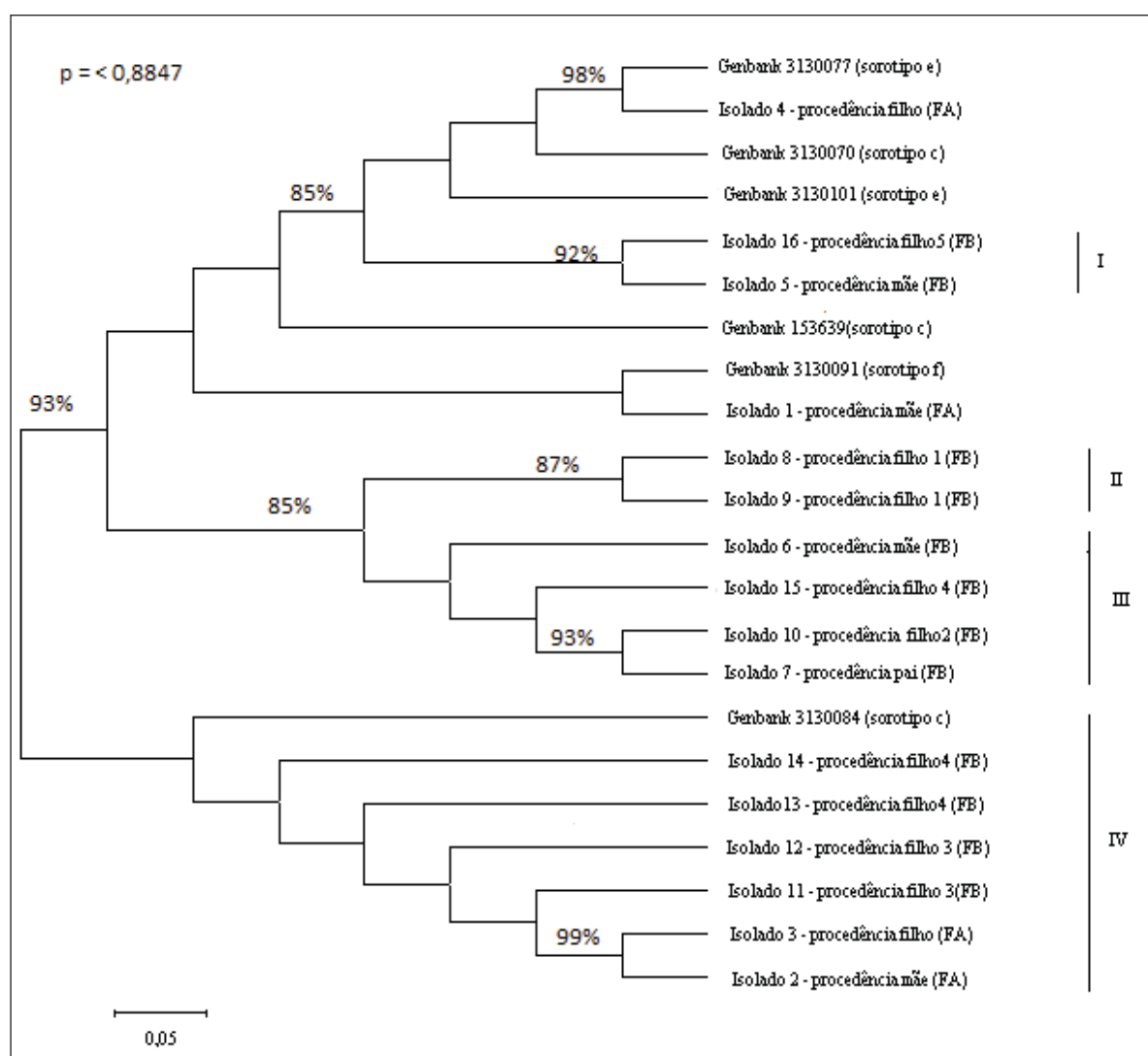


Figura 1– Variabilidade genética baseada nas 16 sequências parciais do gene *gtfB* de *S. mutans* utilizadas neste estudo e 6 sequências de diferentes sorotipos de *S. mutans* selecionados do Genbank . A árvore foi construída pelo Método Máxima Verossimilhança, com correções do modelo Tamura-Nei (JONES *et al.*, 1992), versão RaxML 7.0.4 (STAMATAKIS, 2008)

Legenda: Grupos I, II e III isolados de *S. mutans* procedentes de indivíduos da família B (FB),
Grupo IV isolados de *S. mutans* procedentes de indivíduos da família A (FA) e B (FB)

Estas variações nucleotídicas geraram alterações aminoacídicas, que podem ser visualizadas na tabela 4.

Tabela 4 – Alterações aminoacídicas observadas nos isolados intrafamiliares, considerando os diferentes sorotipos selecionados no Genbank e utilizados neste estudo

Posição	Alteração	Isolados
28	Prolina → Leucina	1,4,5,6,7,10,15,16
61	Alanina → Serina	2,3,11,12,13,14
66	Arginina → Glutamina	2,3,11,12,13,14

As substituições aminoacídicas geraram dois agrupamentos dos isolados, conforme visualização na Figura 2.

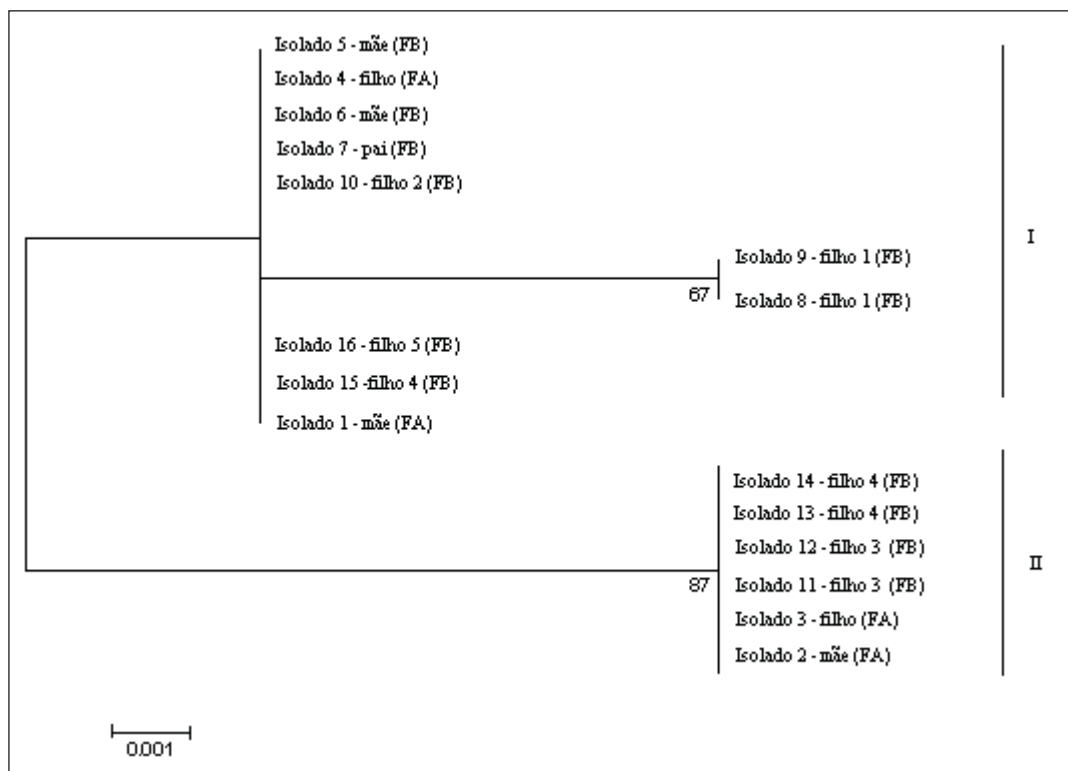


Figura 2 – Padrão de agrupamento baseado na comparação de aminoácidos obtidos por meio de 16 sequências parciais da região GTF-B de isolados intrafamiliares de *S. mutans*. Árvore construída usando o Método Máxima Verossimilhança, baseado na matriz Modelo JTT (JONES *et al.*, 1992), método likelihood RaxML, versão 7.0.4 (STAMATAKIS, 2008). Os números nos nós representam os valores de bootstrap (baseados em 1.000 permutações)

Discussão

Em uma revisão realizada por Slayton (2011), incluindo 46 estudos a respeito de transmissão de *S. mutans*, abordando níveis de colonização entre indivíduos da mesma família e relatando avaliações de intervenção materna visando diminuir a transmissão para a criança, observou-se que *S. mutans* pode ser transmitido intrafamiliarmente, onde a mãe pareceu ser a fonte mais frequente de transmissão, e mais provavelmente no caso de mãe com alta concentração salivar da bactéria. A partir da similaridade na sequência parcial do gene *gtfB* analisada, na Figura 1 observou-se no grupo I isolados procedentes de mãe e filho da família B (isolados 16 e 5), no grupo III reuniram-se os isolados 07 e 10, procedentes de pai e filho (família B), e no grupo IV os isolados 2 e 3, de mãe e filho da família A. Tais resultados indicaram a existência da transmissibilidade intrafamiliar. Dados anteriormente encontrados através de marcadores RAPD (MOREIRA *et al.*, 2007) também evidenciaram tais resultados, onde isolados de mãe e filho, esposos e irmãos, foram agrupados com alta similaridade.

Domejean *et al.* (2010), utilizando *primers* arbitrários, verificaram a presença de genótipos correspondentes de *S. mutans* demonstrando a transmissão horizontal desta espécie entre crianças de 5-6 anos sem relação familiar, indicando assim, a circulação dos biosorotipos entre pessoas próximas. O estudo desenvolvido por Koller *et al.* (2003) usando ribotipagem, suportou a noção da transferência intrafamiliar do *S. mutans* e sugeriu que a colonização das linhagens precocemente adquiridas tende a persistir até o adulto jovem.

Segundo Smith (1998), a ocorrência da transmissão de *S. mutans* em humanos é fato evidente. Contudo, a variação deste evento pode estar associada à suscetibilidade individual, incluindo o período definido como janela de infectividade na infância, erupção dos dentes molares, hipoplasia do esmalte dentário, dieta cariogênica com sacarose, além de fatores específicos do sistema imune salivar e de mucosas, e condições imunológicas do hospedeiro. Segundo Ruby e Goldner (2007), a cárie dental é o resultado da seleção de uma microflora cariogênica, através da ingestão frequente de açúcar pelo hospedeiro. Na população estudada o alto consumo de sacarose foi relatado. Quantidades elevadas de polissacarídeos extracelulares podem envolver a regulação dos

genes *gtf* em resposta ao pH e disponibilidade do carboidrato, influenciando assim a virulência dos biofilmes (KOO *et al.*, 2010), assim como reforçar a competitividade do *S. mutans* no ambiente em relação a outras espécies presentes no biofilme da superfície dental. Além disso, o sistema ecológico bucal é extremamente influenciado por flutuações físicas e químicas, como resultado da ingestão de alimentos associados a medidas de higiene bucal (CRIELAARD *et al.*, 2011), onde a atividade microbiana e o desequilíbrio na microflora residente poderiam ser os mecanismos finais da cárie dental (LUO *et al.*, 2012).

Nas famílias A e B estudadas neste trabalho, observou-se a ocorrência de isolados com similaridade genética entre si, em relação ao gene *gtfB* (isolados 2, 3, 11, 12, 13, 14), os quais eram provenientes de indivíduos com alta prevalência da doença (Grupo IV, Figura 1 e Grupo II, Figura 2). Estes isolados eram procedentes de indivíduos, que apresentaram características biológicas que podem justificar alto risco à doença, observado na casuística apresentada na tabela 1. De acordo com a literatura (BRATTHALL, 1992; MATTOS-GRANER *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2003; BEIGHTON, 2005) o risco biológico baseado na estimativa de *S. mutans* por mL de saliva, tem relação direta com a manifestação clínica, sendo considerado baixo risco de desenvolvimento para indivíduos com baixa estimativa. No entanto, esta relação algumas vezes não reflete a manifestação clínica e representa um indicativo de virulência nos casos de baixa UFC/mL e alta atividade de cárie.

Kishi *et al.* (2009), agrupando mães e filhos a partir dos níveis salivares de *S. mutans* e *S. sobrinus*, revelaram ser esta uma eficiente maneira de predizer tanto a colonização como prevalência de cárie dental em crianças aos 2,5 anos de idade, sugerindo também que estas crianças têm persistentemente altos índices de cárie até os 4,5 anos.

Na família A, a mãe era portadora de prótese total, com todos os dentes perdidos devido à cárie. O filho apresentava cárie ativa associada ao acúmulo de biofilme na superfície dentária e elevado histórico da doença, com nove dentes permanentes comprometidos por lesão cariosa aos 13 anos de idade, revelando um índice CPO-D acima do esperado para esta faixa etária, evidenciando um desequilíbrio do sistema ecológico e, no entanto, apresentava moderada concentração de *S. mutans* na saliva. Este indivíduo era multicolonizado por

biotipos agrupados distintamente, isolados 3 e 4 (Figura 2). Tal fato poderia justificar a agressividade da doença neste hospedeiro.

As alterações nucleotídicas na sequência do gene *gtfB* observadas neste estudo, geraram modificações aminoacídicas que podem ter implicado na configuração e consequente atividade da enzima (Tabela 4), o que pode estar relacionado à mudança do padrão de aderência e consequentemente na virulência destes isolados, uma vez que todos os isolados do agrupamento II (Figura 2) pertenciam a indivíduos com atividade de cárie. No agrupamento I da Figura 2, observou-se reunidos isolados da família A e B, e foi verificado similaridade entre isolados provenientes de indivíduos com diferentes históricos da doença. A variação no padrão clínico da doença e as semelhanças nas sequências aminoacídicas dos isolados, sugere além da transmissibilidade, a existência de portadores passivos de biotipos virulentos, indicando circulação intrafamiliar destes e a presença de fatores endógenos do hospedeiro influenciando na manifestação clínica da doença.

Para Kanasi *et al.* (2010), a realização de testes com biomarcadores microbiológicos para a cárie poderia facilitar a identificação de crianças em um maior risco à cárie e maior necessidade de cuidados.

De acordo com Saxena *et al.* (2008), o *S. mutans* varia sua habilidade em iniciar cáries, pois muitas crianças que apresentavam *S. mutans* não desenvolviam a doença. Portanto, identificar sequências nucleotídicas comuns às linhagens isoladas em crianças com cárie severa precoce na infância (S-ECC) poderá ser uma ferramenta importante e servir como biomarcadores.

Estes resultados demonstraram que o sequenciamento parcial do gene *gtfB* representa um marcador em potencial para elucidar questões referentes a transmissibilidade e virulência de isolados de *S. mutans*.

Referências

1. BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries research**, n. 45, v.1, p.69-86, Feb 2011.
2. CRIELAARD, W.; ZAURA, E.; SCHULLER, A.A.; HUSE, S.M.; MONTIJN, R.C.; KEIJSER, B.F. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. **BCM Medical Genomics**, n.4, p. 22, 2011.
3. DOMEJEAN, S.; ZHAN, L.; DENBESTEN, P.K.; STAMPER, J.; BOYCE, W.T.; FEATHERSTONE, J.D. Horizontal transmission of mutans streptococci in children. **Journal of Dental Research**, n.89, p.51-55, 2010.
4. FUJIWARA, T.; TERAOKA, Y.; HOSHINO, T.; KAWABATA, S.; OOSHIMA, T.; SOBUE, S.; KIMURA, S.; HAMADA, S. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v.161, n.2, p.331-336, Apr, 1998.
5. JONES, D.T.; TAYLOR, W.R.; THORNTON, J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Computer Applications in the Biosciences**, n. 8, p. 275-282, 1992.
6. KANASI, E.; JOHANSSON, I.; LU, S.C.; KRESSIN, N.R.; NUNN, M.E.; KENT, J.R. R.; TANNER, A.C.R. Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. **Journal of Dental Research**, n. 89, v.4, p. 378-383, 2010.
7. KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, n. 16, p.111-120, 1980.
8. KISHI, M.; ABE, A.; KISHI, K.; OHARA-NEMOTO, Y.; KIMURA, S.; YONEMITSU, M. Relationship of quantitative salivary levels of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in mothers to caries status and colonization of mutans streptococci in plaque in their 2.5-year-old children. **Community Dental Oral Epidemiology**, n.37, v.3, p.241-9, Jun 2009.
9. KÖHLER, B.; LUNDBERG, A.B.; BIRKHED, D.; PAPAPANOU, P.N. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. **European Journal of Oral Science**, n. 111, v.5, p.383-9, Oct 2003.
10. KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M.I.; JEON, J.G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **Journal of Bacteriology**, n. 192, v.12, p.3024-32, 2010.

11. LUO, A.H.; YANG, D.Q.; XIN, B.C.; PASTER, B.J.; QIN, J. Microbial profiles in saliva from children with and without caries in mixed dentition. **Oral Diseases**, doi:10.1111/j.1601-0825.2012.01915. John Wiley e Sons A/S, 2012.
12. MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Brasil** -<http://portal.saude.gov.br/portal/saude> acesso em 11 de janeiro de 2012.
13. MOREIRA, M.; VICENTE, V.A.; GLIENKE, C. Genetic variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by rapid markers. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p.729-735, 2007.
14. MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA, I.F.; CARVALHO, Y.; HIGUTI, I.H.; VICENTE, V.A. Methodological variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.4, p. 845-849, Jul/Aug 2010.
15. MOSER, S. A.; MITCHELL, S. C.; RUBY, J.; MOMENI, D.S.; OSGOOD, R.C.; WHIDDON, J.; CHILDERS, N. K. Repetitive extragenic palindromic PCR for study of *Streptococcus mutans* diversity and transmission in human populations, **Journal of Clinical Microbiology**, n. 48, v.2, p.599, 2010.
16. NAKAI, Y.; SHINGA-ISHIHARA, C.; KAJI, M.; MORIYA, K.; MURAKAMI-YAMANAKA, K.; TAKIMURA, M. Xylitol gum and maternal transmission of Mutans streptococci. **Journal of Dental Research**, n.89, v.1, p.56-60, Jan 2010.
17. NAKANO, K.; INABA, H.; NOMURA, R.; NEMOTO, H.; TAKEDA, M.; YOSHIOKA, H.; MATSUE, H.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, K.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 9, v. 44, p. 3313-3317, Sep 2006.
18. RUBY, J.; GOLDNER, M. Nature of symbiosis in oral disease. **Journal of Dental Research**, n.86, p. 8-11, Jan 2007.
19. SAXENA, D.; CAUFIELD, P.W.; LI, Y.; BROWN, S.; SONG, J.; NORMAN, R. Genetic classification of severe early childhood caries using subtracted DNA fragments from *Streptococcus mutans*. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 46, p.2868-73, 2008.
20. SELWITZ, R.H.; ISMAIL, A.I.; PITTS, N.B. Dental caries. **The Lancet**, n. 6, v.369 (9555), p.51-9, Jan 2007.
21. SLAYTON, R.L. Reducing mutans streptococci levels in caregivers may reduce transmission to their children and lead to reduced caries prevalence. **Journal of Evidence-Based Dental Practice**, n. 11, v.1, p.27-8, Mar 2011.
22. SMITH, D.J.; KING, W.F.; AKITA, H.; TAUBMAN, M.A. Association of salivary immunoglobulin A antibody and initial Mutans streptococcal infection. **Oral Microbiology and Immunology**, v.13, n.5, p. 278-285, Oct. 1998.

23. STADEN, R.; JUDGE, D.P.; BONFIELD, J.K. Sequence assembly and finishing methods. **Methods of biochemical Analysis**, v.43, p.303-322, 2001.
24. STAMATAKIS, A.; HOOVER, P.; ROUGEMONT, J. A fast bootstrapping algorithm for the RAxML Web-Servers. **Systematic Biology**, n. 57, p.758–771, 2008.
25. TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (In Press), 2011.
26. TAUBMAN, M.A.; NASH, D.A. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. **Nature Reviews**, n. 6, p.555-563, Jul 2006.

CAPÍTULO V

Um método efetivo para detecção de *Streptococcus mutans*, utilizando sonda específica associada à RCA (*Rolling Circle Amplification*)

Autores

Mônica Moreira¹, Douglas Adamoski³, Jiufeng Sun⁴, Mohammad Javad Najafzadeh⁵, Samarina de França Braga², Mariana Machado Fidelis do Nascimento², Dicler de Sant'Anna Vitor Barbieri², Chirlei Glienke³, Débora do Rocio Klisiowicz², Vânia Aparecida Vicente^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná – UFPR - Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná – UFPR - Brasil

³ Departamento de Genética – Universidade Federal do Paraná– UFPR – Brasil

⁴ Department of Parasitology, The Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University – China

⁵ Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

****Autor correspondente:** vicente@ufpr.br Setor de Ciências Biológicas / C.P. 19020

CEP 81.531-980, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

tel: 55 41 3361.1697 Fax: 55 41 3266.2042- Site: <http://patologia.bio.ufpr>

Resumo

A cárie é uma doença infecciosa multifatorial, causada pela presença do biofilme dental cariogênico, associado à dieta rica em açúcar fermentável e deficiência na higiene bucal; além dos fatores endógenos do hospedeiro, como a suscetibilidade dental e aderência microbiana. O principal patógeno considerado neste dinâmico processo tem sido a bactéria *Streptococcus mutans*, considerada muito virulenta e consequentemente associada ao início e progressão da lesão cáries em humanos. Existe uma relação entre concentração deste microrganismo na boca e a manifestação clínica da doença, comprovada através da incidência deste agente, pelo isolamento em meio seletivo a partir de amostras salivares ou do biofilme dental. No entanto, a maior limitação na detecção de *S. mutans* está na identificação precisa, uma vez que, existe variação de morfologia no meio de cultivo e divergências bioquímicas na identificação dos sorotipos, gerando assim, lacunas no entendimento da epidemiologia da doença. Métodos moleculares representam ferramentas complementares na identificação, taxonomia e elucidação dos mecanismos de virulência destes agentes. O objetivo deste estudo foi testar uma sonda *padlock*, desenvolvida a partir da análise de sequências intergênicas 16S-23S rDNA, utilizando o método *Rolling Circle Amplification* (RCA). Para o estudo foram testadas amostras de DNA de *S. mutans* isoladas da saliva, linhagens referências e também incluído DNA de biofilme dental e saliva. Os isolados foram caracterizados partir do sequenciamento parcial da região 16S-23S e *gtfB* (Beta-glicosiltransferase). O método demonstrou ser efetivo para detecção de *S. mutans* nas amostras analisadas, evidenciando que a utilização de uma sonda específica, por meio de uma abordagem reproduzível, foi de grande utilidade para a rápida detecção e precisa identificação do agente causal da doença.

Introdução

Doenças bucais relacionadas ao biofilme dental afligem a maioria da população mundial e a cárie dental é ainda a doença infecciosa isolada mais prevalente e dispendiosa (KOO *et al.*, 2010; HSU *et al.*, 2010). A cárie dental resulta da interação de bactéria específica presente no biofilme dental, constituintes da dieta e fatores endógenos do hospedeiro. *Streptococcus mutans* é o componente chave na formação de biofilmes associados à doença, embora outros microrganismos possam também estar envolvidos (KOO *et al.*, 2010).

Entre centenas de espécies bacterianas presentes na boca, dados epidemiológicos confirmam que a colonização por *S. mutans* representa o principal papel no início e desenvolvimento da cárie dental (HSU *et al.*, 2010). Culturas microbiológicas podem limitar estudos na identificação de populações

específicas de *S. mutans*, impedindo assim a elucidação completa dos mecanismos de colonização e interação com outras bactérias na boca.

Existem mais de 100 espécies reconhecidas de *Streptococcus* (BERGEY, 2001). Historicamente estes microrganismos vêm sendo classificados por meio de marcadores morfológicos, bioquímicos e pelo método de sorologia estabelecido por Lancefield (1933), baseado na composição de carboidratos de antígenos de parede celular. Tais antígenos, conhecidos como antígeno grupo-específico ou substância C, são representados por polissacarídeos nos grupos A, B, C, E, F e G, ácidos teicóicos grupos D e N e ácidos lipoteicóicos no grupo H (ROSAN, 1973). Esta classificação tem provado ser satisfatória para a maioria dos estreptococos patogênicos, mas a sua aplicação generalizada é dificultada pelo fato que antígenos grupo-específico para outras espécies podem estar ausentes ou compartilhados entre táxons distintos. Os estreptococos podem também ser organizados em seis agrupamentos baseados na sequência do gene 16S rDNA: os grupos Mitis, Anginosus, Pyogenic, Bovis, Salivarius e Mutans; este último abrangendo as espécies *S. downei*, *S. sobrinus* e *S. mutans* (NOBBS *et al.*, 2009).

Isolados dentro de uma espécie podem diferenciar-se em um traço comum, e também a mesma linhagem pode exibir variabilidade bioquímica (LAL *et al.*, 2011). Assim, testes imunológicos e métodos genéticos têm sido usados para a diferenciação de isolados, além dos testes bioquímicos clássicos. Devido a sua alta especificidade e sensibilidade, a PCR vem sendo aplicada em larga escala em diagnóstico e pesquisa envolvendo espécies do gênero (AL-AHMAD *et al.*, 2006).

Os genes e proteínas contêm repetições seriadas de motivos de sequência que aumentam a atividade e especificidade fisiológica do metabolismo. Devido a este valor seletivo de tais repetições, marcadores geradores de sequências de repetições seriadas têm sido investigados (FIRE e XU, 1995). O marcador denominado círculo rolante de amplificação possibilita a amplificação de fragmentos relativamente longos no intervalo de kilobases e tem sido aplicado para fins de detecção de sequências específicas. O processo descoberto nos anos 90 (FIRE e XU, 1995) mais conhecido como RCA (*Rolling Circle Amplification*) é uma técnica isotermal de amplificação sensível a pequenas concentrações de DNA, específica e reprodutível.

Em 1994, Nilson *et al.* desenvolveram sondas de oligonucleotídeos que são úteis para a detecção localizada de ácidos nucléicos específicos, para aplicação em *Rolling Circle Amplification* (RCA). Esta sonda cadeado (*padlock*) é um oligonucleotídeo circularizável, que consiste de dois segmentos complementares terminais ao 3' e 5' da sequência alvo, através de uma região genética vinculadora. Quando as regiões terminais 3' e 5' dos oligonucleotídeos da sonda são justapostos à sequência de interesse, os finais da sonda podem ser ligados pela ação de uma DNA ligase para formar uma molécula de DNA circular que pode ser amplificada por RCA. Desde então esta técnica vem sendo utilizada para fins de diagnóstico e pesquisa como, por exemplo, na subtipagem de *Streptococcus agalactiae*, sorotipo III (TONG, *et al.*, 2007); na identificação molecular de *Penicillium marneffei* (SUN *et al.*, 2010) e na identificação rápida de patógenos fúngicos como leveduras negras (NAJAFZADEH *et al.*, 2011).

Os diagnósticos baseados no RCA são caracterizados pela boa reprodutibilidade, com menos erros de amplificação comparados a PCR (DEMIDOV, 2002) e portanto, recomendada para uma identificação molecular rápida de microrganismos (NAJAFZADEH *et al.*, 2011). Esta técnica permite a detecção de uma única alteração nucleotídica e previne uma amplificação não específica, um fator de risco comum na PCR convencional. Desta forma, RCA é particularmente útil para discriminar espécies proximamente relacionadas ou genótipos dentro da mesma espécie (SUN *et al.*, 2011).

Como a cárie dental é uma doença infecciosa de prevalência mundial, com a bactéria *S. mutans* sendo considerada por excelência de colonização indígena da cavidade bucal, sua identificação genética é essencial para estudos da diversidade e transmissibilidade entre humanos (MOSEER *et al.*, 2010). O objetivo deste trabalho foi identificar e diferenciar *S. mutans* dos outros estreptococos usualmente isolados na boca, através da utilização de uma sonda específica, baseada em metodologia descrita por Tong *et al.* (2007).

Métodos

Isolados Bacterianos

Para o estudo foram caracterizados 9 isolados de *S. mutans*, através de primers específicos, gerados a partir do sequenciamento parcial da região intergênica 16S-23S (CHEN *et al.*, 2004) e do gene que codifica para a enzima Beta-glicosiltransferase (OHO *et al.*, 2000); amostras de biofilme dental e saliva, e linhagens de referência, totalizando 16 amostras (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados utilizados neste estudo, segundo procedência e epidemiologia da doença

Isolado	Nomenclatura	Número de Acesso	Substrato	Geografia
<i>S. mutans</i>	Isolado 1	HE962158	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 2	HE962161	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 3	HE962162	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 4	HE962164	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 5	HE962167	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 6	HE962168	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 7	HE962170	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 8	HE962171	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	Isolado 9	HE962173	saliva	Brasil
<i>S. mutans</i>	ATCC25175	UO2919	dentina cariada	Inglaterra
<i>S. sobrinus</i>	ATCC33478	AY188349	biofilme dental	Suécia
<i>S. pyogenes</i>	ATCC13540	EF613287	orofaringe	EUA

HE -European Nucleotide Archive

ATCC- American Type Culture Collection

Extração de DNA

Todos os isolados de *Streptococcus* foram cultivados com caldo BHI (brain heart infusion) e incubados a 37°C por 24h. As culturas obtidas tinham aproximadamente 10^8 células e foram centrifugadas a 49000 g por 2 min e o precipitado foi transferido para uma mistura de sílica e celite em tampão CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide); e a extração do DNA realizada de acordo com a metodologia descrita por Moreira *et al.* (2010). As amostras de DNA total da saliva e do biofilme dental foram obtidas com a mesma metodologia.

Sonda cadeado e primers

A sonda de oligonucleotídeos foi desenvolvida a partir de sequências da região intergênica 16S-23S do genoma de microrganismos do gênero *Streptococcus* e *Enterococcus* pesquisadas no GenBank, e de *S. mutans* do banco de dados do Laboratório de Biologia Molecular – Labmicro- Biomol, UFPR (Tabela 2). A sonda foi desenhada a partir de descrição prévia (Wang *et al.*, 2005).

Tabela 2 – Sequências nucleotídicas analisadas para desenho da sonda cadeado

Espécie	ATCC/ Número	Outras Referências/Número	Gene/Região Analisada
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 9759		rDNA/16S-23S
<i>Streptococcus sanguinis</i>		SSI1655/99	rDNA /16S-23S
<i>Streptococcus rattii</i>	ATCC19645	CCUG 27642	rDNA /16S-23S
<i>Streptococcus criceti</i>	ATCC19642	24472-01, 24327-01, 26688-01, 23537-01	rDNA /16S
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC13540		rDNA /16S
<i>Streptococcus sanguinis</i>		GumJ19, GRTE15B, TeJ10, ChDC OS38, TTE17, ChDC B203, TeTG, RY053, SA049	rDNA /16S
<i>Streptococcus sobrinus</i>	ATCC33478	TT020 WWC_C5ALM116, WWC_C5MLM034, JB026, JC064	rDNA /16S
<i>Streptococcus salivarius</i>		FP051, RW018, FP002, FP045, FP008, FQ015, FQ067, NK037, EQ075	rDNA /16S
<i>Streptococcus mutans</i>	ATCC25175	UC013, UC023, UC003, TT062, TT061	rDNA /16S
<i>Enterococcus faecalis</i>		UPAA100, UPAA102, FUA3333, CD1, EF608, Taj-KH 119, 3-12, Probio-53, TX0102	rDNA /16S

A sonda com 100 nucleotídeos (nt) de comprimento foi sintetizada pela IDT (Integrated DNA Technologies), e era constituída por duas sequências alvo complementares de 42 nt com uma região espaçadora para facilitar a formação de alça e fornecer um modelo para o primer de ligação da RCA, segundo metodologia descrita por Tong *et al.* (2007) com adaptações. Para assegurar a especificidade da

sonda cadeado ao genoma, esta foi projetada com o mínimo de estrutura secundária e com uma T_m (melting temperature) da extremidade 5' de 48°C. Para aumentar a especificidade discriminativa, a extremidade do braço de ligação 3' foi projetado com uma T_m de 49°C. A região da ligação genética também foi projetada para minimizar qualquer semelhança com potenciais sequências de reação cruzada após pesquisa no BLAST. Além disso, os primers utilizados para amplificar o sinal da sonda cadeado específica, durante a RCA, foram desenhados especificamente para a região de ligação (Tabela 3).

Tabela 3 – Sequências da sonda e primers usados neste estudo

Sonda/primers	Sequências (5'-3')
Sonda	5PO4' GTAAAAGCCCTATAGCGC AGATCATGCTTCTTCGGTGCCCATGAGGTGCG GATAGCTCGCGCAGACACGATAGTCTAG TTTCATTGACAATTGAATAGCTA
Primer-1	ATGGGCACCGAAGAAGCA
Primer-2	CGCGCAGACACGATA

Nota:

- As sequências em negrito são as pontas de ligação da sonda cadeado, as quais são unidas por uma região não específica de ligação.
- RCA primer-1 liga-se na sonda cadeado, gerando um ssDNA longo. A sua sequência é a mesma que a do segmento sublinhado, em sentido reverso.
- RCA primer-2 liga-se ao ssDNA nascente, a partir do momento que os seus locais de ligação estiverem disponíveis. Cada primer reverso ligado estende e desloca os primers a jusante e os seus produtos estendidos. A sua sequência é a mesma que a dos segmentos indicados em itálico.

Ligação da sonda cadeado

A reação de ligação da sonda cadeado foi realizada com 1 pmol de DNA obtido a partir do genoma total dos isolados, amostras de saliva e do biofilme dental, que foi adicionado com 2 U of pfu DNA ligase (Stratagene, Integrated Sciences) e 0.1 μ M da sonda cadeado em 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Igepal, 0.01 mM rATP, 1 mM DTT num volume total de reação de 10 μ L. A ligação de múltiplo ciclo foi conduzida com um ciclo de 5 min a 94 °C seguido de 5 ciclos de 94 °C 30 s e 4 min de ligação a 60 °C (WANG *et al.*, 2005). A verificação da ligação da sonda foi visualizada em gel de agarose a 1%.

Reação de Rolling Circle Amplification (RCA)

Dois microlitros do produto de ligação foram usados como molde (template) para RCA. As reações foram realizadas em um volume de 25 µl, contendo 8 U of Bst DNA polymerase (New England Biolabs), 400 µM da mistura de DNTP (deoxynucleoside triphosphate), 10 pmol de cada primer do RCA em água destilada. Sinais de circularização da sonda foram amplificados através da incubação a 65 °C por 60 min e a acumulação dos produtos de DNA dupla fita foi visualizado em um gel de agarose a 1,4% para verificar a especificidade da ligação sonda-molde (template). Reações positivas foram representadas por um padrão de banda semelhante ao do *ladder*, enquanto reações negativas foram reconhecidas pela ausência da banda.

Resultados e Discussão

Para discriminar *S. mutans* dos outros *Streptococcus* bucais, as regiões 16S e intergênicas 16S-23S foram analisadas (Tabela 2). Entre as regiões analisadas, a que demonstrou apresentar alteração nucleotídica compatível com o método proposto, foi a região 16S-23S. Desta forma, a sonda cadeado específica foi desenhada (Tabela 3), e aplicada em diferentes amostras de DNA (Tabela 1).

As reações de RCA foram positivas para as amostras de DNA de *S. mutans*, linhagens HE e linhagens ATCC testados (Tabela 1), com evidencição da ligação da sonda circularizável ao DNA alvo (Figura 1 A). De acordo com o gel de eletroforese mostrado na Figura 1A, houve a ligação da sonda específica ao DNA alvo de amostras de DNA dos isolados de *S. mutans* procedentes da saliva e biofilme dental, e linhagem referência ATCC 25175 (faixas 4, 6 e 7). As amostras de DNA de *S. mutans* (faixa 7) e da linhagem referência apresentaram um padrão semelhante de circularização da sonda, próximo a 500pb. No entanto, na amostra com DNA extraído de biofilme total (faixa 6), houve um padrão diferenciado de circularização da sonda com aproximadamente 700pb. Nas amostras de DNA utilizadas como controle negativo, não houve ligação evidente da sonda cadeado específica para *S. mutans* (faixa 2, 3 e 5). Com aproximadamente 100pb pode ser visualizada a sonda linearizada, em todas as reações de ligação sonda-DNA alvo testadas.

As amostras positivas para a ligação com a sonda foram amplificadas, gerando um padrão típico de produtos através da reação de RCA (Figura 1B).

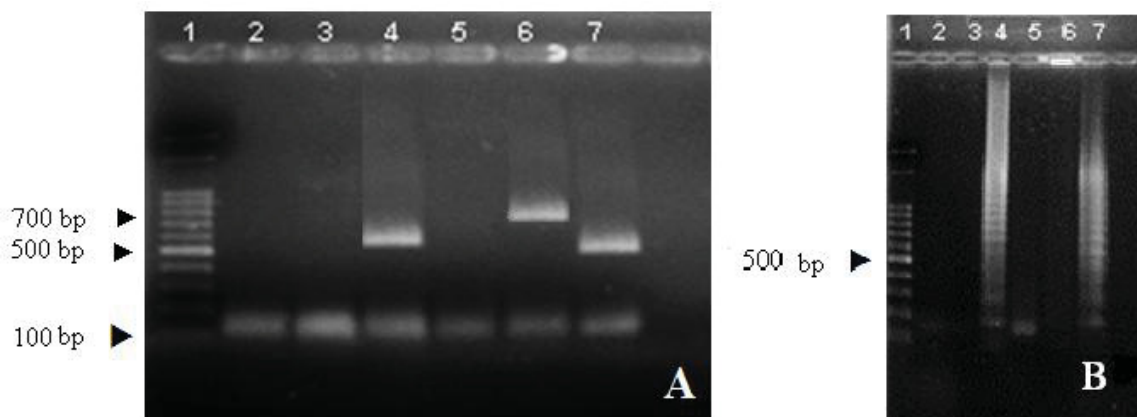


Figura 1 – Perfil de eletroforese da sonda padlock específica para *S. mutans* em gel de agarose a 1,4%. **A- Produtos de ligação da sonda:** 1 – Marcador molecular de 100 pb, 2 – controle branco, com água, 3 – amostra de DNA de *S. pyogenes* linhagem ATCC 13540, 4 – amostra de DNA de *S. mutans* linhagem ATCC 25175, 5 – amostra de DNA de *S. sobrinus* linhagem ATCC 33478, 6 – amostra de DNA total de biofilme dental, 7 – amostra de DNA de isolado salivar de *S. mutans* HE 962158. **B- Gel representativo da especificidade da sonda RCA:** 1 – Marcador molecular de 100 pb, 2 – controle branco, com água, 3 – amostra de DNA de *S. pyogenes* linhagem ATCC 13540, 4 – amostra de DNA de *S. mutans* linhagem ATCC 25175, 5 – amostra de DNA de *S. sobrinus* linhagem ATCC 33478, 6 – amostra de DNA total de biofilme dental, 7 – amostra de DNA de isolado salivar de *S. mutans* HE 962158

A amostra de DNA total do biofilme dental coluna 6 (figura 1B), apresentou um padrão diferenciado na amplificação por RCA comparado com o DNA de *S. mutans*, pois segundo Demidov (2005), em alguns casos, os produtos de RCA são tão grandes, que não são capazes de entrar no gel, ficando retidos no poço inicial.

Além disso, foram testadas diferentes amostras, incluindo DNA de *S. mutans* isolados da saliva HE962158 e HE96217 (faixa 3 e 4), amostra de DNA de biofilme dental obtido de paciente com alto histórico de cárie (faixa 5), amostra de DNA total de saliva (faixa 6) e amostra de DNA de *S. mutans* ATCC 25175 (faixa 7), amostra de DNA de *S. sobrinus* ATCC33478 (faixa 8), e amostra de DNA de *S. pyogenes* ATCC13540 (faixa 9) (Figura 2).

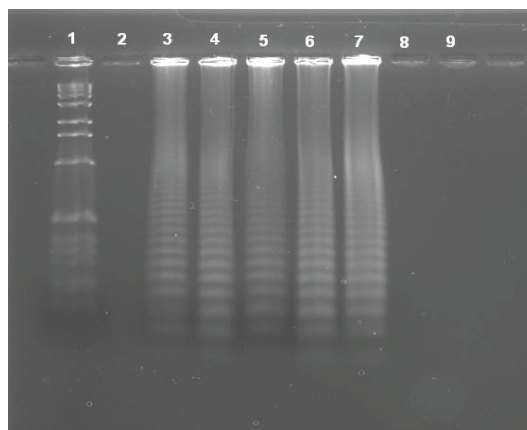


Figura 2 – Análise dos produtos de RCA products em eletroforese em gel de agarose a 1,4%. 1 – marcador molecular 100 pb; 2- controle branco; 3 e 4 – amostra de DNA de *S. mutans* isolados 1 e 7 (HE 962158 e HE962170); 5 – amostra de DNA de biofilme total; 6 – amostra de DNA total da saliva; 7 – amostra de DNA de *S. mutans* (linhagem ATCC 25175); 8 – amostra de DNA de *S. sobrinus* (linhagem ATCC33478); 9 – amostra de DNA de *S. pyogenes* (linhagem ATCC13540)

De acordo com Zou *et al.* (2012), o método RCA pode ter um grande potencial no diagnóstico clínico, porque diferente da PCR, os métodos de amplificação isotermal de DNA não requerem nenhum equipamento especial para a reação de amplificação, sendo custo-efetivos, tendo um baixo risco de contaminação cruzada de amplicons, além de ser altamente sensível. Como resultado, a amplificação por círculos rolantes (RCA) pode ser amplamente usada e várias aplicações baseadas no método RCA têm sido desenvolvidas, como detecção de DNA e genotipagem.

A cárie dental tem uma etiologia polimicrobial, com o *S. mutans* sendo o maior agente patogênico. Estudos convencionais de *S. mutans* tem se baseado fortemente no cultivo para identificar e caracterizar *S. mutans* na cavidade bucal. As maiores limitações nos métodos de cultura incluem um limite finito na detecção de *S. mutans* em amostras clínicas; uma morfologia inconsistente dependendo do meio de cultura utilizado; e seu alto custo e necessidade de trabalho laboratorial intensivo. Além disso, o cultivo requer amostras viáveis, tornando sua aplicabilidade inviável em estudos epidemiológicos de campo e em pesquisa de alto rendimento. Devido ao método de cultura convencional muitas vezes limitar os estudos de campo, de colonização e interação de *S. mutans* com outras

bactérias na cavidade oral, um considerável número de sondas e primers baseados no DNA têm sido desenvolvidos (CHEN *et al.*, 2007).

Muitos dos primers ou sondas específicos são desenhados para genes alvos específicos que estão associados à virulência em *S. mutans*, como as glicosiltransferases (OHO *et al.*, 2000; YANO *et al.*, 2002), frutossiltransferases (SMORAWINSKA; KURAMITSU, 1992), dextranase (IGARASHI *et al.*, 1996), proteína B ligadora de glucano (SMITH *et al.*, 2003), proteína de superfície celular (LEE; BORAN, 2003). Outros conjuntos de primers para PCR foram designados para amplificar regiões específicas do gene 16S rDNA de *S. mutans* (WANG *et al.*, 2002; YANO *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2003; HOSHINO *et al.*, 2004), e da região intergênica 16S-23S rDNA de *S. mutans* (HASSAN *et al.*, 2003; CHEN; TENG; CHANG, 2004; TUNG *et al.*, 2007).

Segundo Hassan *et al.* (2003), o espaço intergênico ribossomal, um segmento de DNA que encontra-se entre a subunidade do gene 16S e 23S rRNA, provou ser mais variável que os genes ribossomais 16S e 23S adjacentes, sugerindo que este segmento de DNA poderia estar sob uma pressão seletiva mínima, comparada aos genes rRNA, permitindo assim uma diferenciação entre linhagens dentro de espécie, ou a identificação da espécie devido a forte variação entre espécies dentro do gênero.

A utilização de sequências intergênicas 16S-23S fornece uma abordagem útil para a identificação deste patógeno, em uma plataforma molecular, ao lado de sequências do gene 16S rDNA (TUNG *et al.* (2007). Neste contexto, a técnica de RCA vem se tornando uma ferramenta de amplificação de DNA altamente versátil com amplas aplicações em genômica, proteômica, diagnóstico, biosensoriamento, descoberta de drogas e nanotecnologia (ZHAO *et al.*, 2008). Porém, o desenvolvimento do teste RCA é relativamente caro, mas com aplicações de alto rendimento, o desempenho do teste será rápido e barato. Para a identificação de um pequeno volume de casos, o método é menos adequado (NAJAFZADEH *et al.*, 2011).

Esta investigação revelou que a técnica RCA associada à sonda cadeado é precisa e útil para a detecção de *S. mutans* para isolados recuperados em agar. Para testagem diretamente na saliva e no biofilme dental, é possível fazer a amplificação a partir da extração do DNA total das amostras. Em resumo, esta é a

primeira proposta de sonda cadeado para *S. mutans*, que demonstrou ser muito específica considerando as pesquisas de sequências alvo no GenBank, assim como quando avaliada em amostras de DNA, fazendo da sonda, associada à técnica RCA uma promissora ferramenta de triagem para identificação clínica de *S. mutans*.

Agradecimento

Os autores agradecem o apoio da CAPES, Fundação Araucária e UFPR.

Referências

1. AL-AHMAD, A.; AUSCHILL, T.M.; BRAUN, G.; HELLWIG, E.; ARWEILER, N.B. Overestimation of *Streptococcus mutans* prevalence by nested PCR detection of the 16S rRNA gene. **Journal of Medical Microbiology**, n.5, v.1. p.109, Jan 2006.
2. BERGEY, D.H. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, Williams e Wilkins. 2001. v. 3, p.1842-1853.
3. CHEN, C.C.; TENG, L.J.; CHANG, T.C. Identification of clinically relevant viridians group Streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.6 p. 2651-2657, 2004.
4. DEMIDOV, V.V. Rolling-circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, n.2, p.542–548, 2002.
5. DEMIDOV, V.V. Rolling-circle amplification (RCA). **Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics**. New York, Marcel Dekker, Inc. 2005. p.1177.
6. FIRE, A.; XU, S. Rolling replication of short DNA circles. **Biochemistry**, n. 92, p. 4641-4645, 1995.
7. HASSAN, A.A.; KHAN, I.U.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. Inter and intraspecies variations of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of various Streptococcal Species. **Systematic and Applied Microbiology**, n.26, p.97-103, 2003.
8. HOSHINO, T.; KAWAGUCHI, M.; SHIMIZU, N.; HOSHINO, N.; OOSHIMA, T.; FUJIWARA, T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. **Diagnostic Microbiological and Infection Disease**, n. 48, p.195–199, 2004.

9. HSU, K. L. K.; OSGOOD, R. C.; CUTTER, G. R.; CHILDRES, N. K. Variability of two plaque sampling methods in quantitation of *Streptococcus mutans*. **Caries Research**, v. 44, p. 160- 164, 2010.
10. IGARASHI, T.; YAMAMOTO, A.; GOTO, N. Rapid identification of mutans streptococcal species. **Microbiology and Immunology**, n.40, p.867–871, 1996.
11. KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M.I.; JEON, J.G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **Journal of Bacteriology**, n.192, v.12, p.3024-32. Epub 2010.
12. LAL, D.; VERMA, M.; LAL, R. Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, n.10, p. 28. Published online 2011 June 25, 2011.
13. LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. **Journal of Experimental Medicine**, p. 57571-595, 1933.
14. LEE, S.F.; BORAN, T.L. Roles of sortase in surface expression of the major protein adhesin P1, saliva-induced aggregation and adherence, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, n.71, p.676- 681, 2003.
15. MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA, I.F.; CARVALHO, Y.; HIGUTI, I.H.; VICENTE, V.A . Methodological variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n.53, v.4, p. 845-849, Jul/Aug 2010.
16. MOSER, S. A.; MITCHELL, S. C.; RUBY, J. D.; MOMENI, S.; OSGOOD, R. C.; WHIDDON, J.; CHILDERS, N. K.. Repetitive extragenic palindromic PCR for study of *Streptococcus mutans* diversity and transmission in human populations. **Journal of Clinical Microbiology**, n.48, v.2, p.599, 2010.
17. NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; VICENTE, V.A.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**. n.54, v.5, p.577-82, 2011.
18. NILSSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B.P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, n. 265, p. 2085–2088, 1994.
19. NOBBS, A.H.; LAMONT, R.J.; JENKINSON, H.F. *Streptococcus* adherence and colonization. **Microbiology Molecular and Biology Review**, n.73, v.3, p.407-50, 2009.
20. OHO, T.; YAMASHITA, Y.; SHIMAZAKI, Y.; KUSHIYAMA, M.; KOGA, T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. **Oral Microbiology and Immunology**, n. 15, v.4, p.258-62, 2000.

21. ROSAN, B. Antigens of *Streptococcus sanguis*. **Infection and Immunity**, p. 7205-211, 1973.
22. SMITH, D.J.; KING, W.F.; BARNES, L.A.; PEACOCK, Z.; TAUBMAN, M.A. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein B. **Infection and Immunity**, n.71, p.1179–1184, 2003.
23. SMORAWINSKA, M.; KURAMITSU, H.K. DNA probes for detection of cariogenic *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, n. 7, p.177–181, 1992.
24. SUN, J.; NAJAFZADEH, M.J.; ZHANG, J.; VICENTE, V.A.; XI, L.; DE HOOG, G.S. Molecular identification of *Penicillium marneffe* using rolling circle amplification. **Mycoses**, n.54, v.6, p.751-9, 2011.
25. TONG, Z.; KONG, F.; WANG, B.; ZENG, X.; GILBERT, G.L. A practical method for subtyping of *Streptococcus agalactiae* serotype III, of human origin, using rolling circle amplification. **Journal of Microbiological Methods**, n.70, p. 39-44, 2007.
26. TUNG, S.K.; TENG, L.J.; VANECHOUTTE, M.; CHEN, H.M.; CHANG, T.C. Identification of species of *Abiotrophia*, *Enterococcus*, *Granulicatella* and *Streptococcus* by sequence analyses of the ribosomal 16S-23S intergenic spacer region. **Journal of Medical Microbiology**, n.56, p.504-513, 2007.
27. WANG, B.; POTTER, S.J.; LIN, Y.; CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E.; SU, Y.; MA, X.; HOU, Y.; SAKSENA, N.K.. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, n.43, p. 2339–2344, 2005.
28. WANG, J.; LI, C.; XIAO, B.; LIU, J. Detection of cariogenic *Streptococcus mutans* by quantitative polymerase chain reaction. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, n. 37, p.281–283, 2002.
29. YANO, A.; KANEKO, N.; IDA, H.; YAMAGUCHI, T.; HANADA, N. Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, n. 217, p.23–30, 2002.
30. YOSHIDA, A.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; KAWADA, M.; OHO, T.; KOGA, T. Development of a 5 nuclease-based realtime PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Journal of Clinical Microbiology**, n.41, p.4438–4441, 2003.
31. ZHAO, W.; ALI, M.M.; BROOK, M.A.; LI, Y. Rolling Circle Amplification: Applications in Nanotechnology and Biodetection with Functional Nucleic Acids. **Angewandte Chemie International Edition**, n.47, v.34, p. 6330–6337, Aug 2008.
32. ZOU, B.; MA, Y.; WU, H.; ZHOU, G. Signal amplification by rolling circle amplification on universal flaps yielded from target-specific invasive reaction. **Analyst**, n.137, p.729-734, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante muitos anos, aceitou-se a idéia de que em qualquer população, praticamente todas as pessoas teriam o mesmo grau de suscetibilidade ao desenvolvimento de lesões de cárie, caso apresentassem dieta cariogênica ou higiene bucal deficiente. Porém nem todos os indivíduos ou grupos apresentam a mesma história natural da doença. Alguns indivíduos, a partir da infecção com o agente etiológico primário, *S. mutans*, são colonizados e dependendo dos fatores genéticos do microrganismo e do indivíduo; dos fatores ambientais e em decorrência do tempo de exposição, podem apresentar um alto risco de desenvolver a cárie.

A elucidação dos múltiplos fatores, genéticos e ambientais, envolvidos na colonização pelo microrganismo e no desenvolvimento da doença vem sendo muito pesquisada, buscando alcançar um nível de conhecimento que possa ser utilizado no tratamento clínico e na prevenção da ocorrência da cárie.

Este trabalho foi realizado a partir de dados epidemiológicos, microbiológicos e moleculares, os quais representam importantes ferramentas para uma melhor compreensão do dinâmico processo de interação bactéria-hospedeiro, fatores de virulência, transmissibilidade e colonização.

CONCLUSÃO

A existência de diferentes padrões de expressão de virulência em *S. mutans* neste estudo foi evidenciada. Através da caracterização molecular deste microrganismo, houve a diferenciação dos genótipos de *S. mutans* a partir do sequenciamento do gene *gtfB*, com identificação de diferenças nucleotídicas em isolados salivares provenientes de indivíduos com cárie. Demonstrando ser este um importante biomarcador para detecção de transmissibilidade e virulência de *S. mutans*, e assim concluiu-se que:

O uso do método ultrassom com a associação de sílica e celite no CTAB teve boa reprodutibilidade, foi de simples execução e permitiu extração de DNA das bactérias Gram-positivas, com alta qualidade.

O sequenciamento parcial do gene *gtfB* representou um marcador em potencial para elucidar questões referentes a transmissibilidade, colonização e virulência de *S. mutans*, uma vez que determinadas variações aminoacídicas podem justificar as diferenças no padrão de colonização destas linhagens, o que pode refletir no risco biológico ao desenvolvimento da cárie dental.

A variação no padrão clínico da doença e as semelhanças nas sequências aminoacídicas dos isolados, sugeriu além da transmissibilidade, a existência de portadores passivos de biotipos virulentos, indicando circulação intrafamiliar destes e a presença de fatores endógenos do hospedeiro influenciando na manifestação clínica da doença.

As sondas cadeado espécie-específicas testadas a partir da metodologia proposta neste estudo foram exclusivas e de aplicação rápida, fazendo desta sonda, em associação com a técnica RCA, uma promissora ferramenta de triagem para identificação clínica de *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- AHN, S.J.; AHN, S.J.; WEN, Z.T.; BRADY, L.J.; BURNE, R.A. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in presence of saliva. **Infection and Immunity**, n.9, v. 76, p.4259-4268, 2008.
- BARBIERI, D.S.V. **Análise da aderência “in vitro” de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* na superfície dentária**. Curitiba, 2005. Dissertação de Mestrado, Área de concentração: Microbiologia, Universidade Federal do Paraná.
- BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.33:4, p. 248–255, 2005.
- BOWDEN, G.H.; HAMILTON, I.R. Survival of oral bacteria. **Critical Reviews in Oral Biology e Medicine**, v.9, p.54-85, 1998.
- BOWEN WH, KOO H. Biology of *Streptococcus mutans* - derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Research**, n.45, v.1, p.69-86, 2011.
- BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. **European Journal of Oral Science**, v.100, p. 47-51, 1992.
- CARLSSON, P., OLSSON, B. AND BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Archives of Oral Biology**, v.30, p.265-268, 1985.
- CAUFIELD, P.W.; CUTTER, G.R.; DASANAYAKE, A.P. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: Evidence for a discrete window of infectivity. **Journal of Dental Research**, v.72, p.37-45, 1993.
- CAUFIELD, P.W.; RATANAPRIDAKUL, K.; ALLEN, D.N. Plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* cluster within family and racial cohorts: implications for natural transmission. **Infection and Immunity**, v.56, p.3216-3220, 1988.
- CAUFIELD, P.W.; WALKER, T.M. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p.74-278, 1989.
- CORBY, P.M.; BRETZ, W.A.; HART, T.C.; SCHORK, N.J.; WESSEL, J.; LYONS-WEILER, J.; PASTER, B.J. Heritability of oral microbial species in caries-active and caries-free twins. **Twin Research and Human Genetics**, v.10, p.821–828, 2007.
- CRIELAARD, W.; ZAURA, E.; SCHULLER, A.A.; HUSE, S.M. ; MONTIJN, R.C.; KEIJSER, B.J.F. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. **BCM Medical Genomics**, v.4, p.22, 2011.

DEMIDOV, V.V. Rolling- circle amplification in DNA diagnostics: the power of simplicity. **Expert Review of Molecular Diagnostic**, n.2, v.6, 2002.

DOMEJEAN, S.; ZHAN, L.; DENBESTEN, P.K.; STAMPER, J.; BOYCE, W.T.; FEATHERSTONE, J.D. Horizontal transmission of mutans streptococci in children. **Journal of Dental Research**, v.89, p.51-55, 2010.

EMANUELSSON, I.M.; THORNQVIST, E. Distribution of mutans streptococci in families: a longitudinal study. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.59, p.93-98, 2001.

EMANUELSSON, I.R.; LI, Y.; BRATTHALL, D. Genotyping shows different strains of mutans streptococci between father and child and within parental pairs in Swedish families. **Oral Microbiology and Immunology**, v.13, p.271-277, 1998.

EMANUELSSON, R.; WANG, W. Demonstration of identical strains of mutans streptococci within Chinese families by genotyping. **European Journal of Oral Science**, v.106, p.788 -794, 1998.

FEJERSKOV, O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. **Caries Research**, v.38, p.182–191, 2004.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B. Is Dental Caries an Infectious Disease? Diagnostic and Treatment Consequences for the Practitioner. **Nordic Dentistry**, Copenhagen, Quintessence Copenhagen , p. 141–152, 2003.

FIRE, A.; XU, S. Q. Rolling replication of short DNA circles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p.4641-4645, 1995.

GRONRÖÖS, L.; ALALUUSUA, S. Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR fingerprinting. **Caries Research**, v.34, p.474-80, 2000.

HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, S. M. Current status of a mucosal vaccine against dental caries, **Oral Microbiology and Immunology**, n.14, v.1, p.1-20, 1999.

HAMADA, S. Overview of the biology of *Streptococcus mutans*. In: **Molecular microbiology and immunobiology of *Streptococcus mutans***. Hamda, S.; Michalek, S.; Kiyono, H.; Menaker, L.; McGhee, J. eds. Elsevier Science Publishing Inc.: New York; p.7-20, 1986.

HASSAN, A.A.; KHAN, I.U.; ABDULMAWJOOD, A.; LÄMMLER, C. Inter and intraspecies variations of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region of various Streptococcal Species. **Systematic and Applied Microbiology**, 26, 97-103, 2003.

ISLAM, B.; KHAN, S.N.; KHAN, A.U. Dental caries: from infection to prevention. **Medical Science Monitor**, n.13, v.11, p.196-203, 2007.

JEON, J.G.; ROSALEN, P.L.; FALSETTA, M.L.; KOO, H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries Research**, v.45, p.243-263, 2011.

JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, R.J. Transmission of the oral bacterium *Streptococcus mutans* to young *Macaca fascicularis* monkeys from human nurse attendants. **Archives of Oral Biology**, v. 30, p.863-864, 1985.

KLEIN, M.I.; FLORIO, F.M.; PEREIRA, A.C.; HÖFLING, J.F.; GONÇALVES, R.B. Longitudinal study of transmission, diversity and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 4620-4626, 2004.

KÖHLER, B.; LUNDBERG, A.B.; BIRKHED, D.; PAPAPANOU, P.N. Longitudinal study of intrafamilial mutans streptococci ribotypes. **European Journal of Oral Science**, n.111, v.5, p.383-9, 2003.

KOLENBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, n.175, v.11, p. 3247-3252, 1993.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M.I.; JEON, J.G. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. **Journal of Bacteriology**, n.192, v.12, p.3024-32. Epub 2010 Mar 16, 2010.

KOZAI, K.; NAKAYAMA, R.; TEDJOSASONGKO, U.; KUWAHARA, S.; SUZUKI, J.; OKADA, M.; NAGASAKA, N. Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. **Microbiology and Immunology**, n.43, v.2, p.99-106, 1999.

KRETH, J.; MERRIT, J.; SHI, W.; QI, F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus Sanguinis* in the dental biofilm. **Journal of Bacteriology**, n.187, v.21, p. 7193-7203, 2005.

LAL, D.; VERMA, M.; LAL, R. Exploring internal features of 16S rRNA gene for identification of clinically relevant species of the genus *Streptococcus*. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobial**, n. 10, p. 28, 2011. Published online 2011 June 25

LEME, A.F.P.; KOO, H.; BELLATO, C.M.; BEDI, G.; CURY, J.A. The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. **Journal of Dental Research**, v.85, p.878-887, 2006.

LI, Y.; CAUFIELD PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **Journal of Dental Research**, v.74, p.681-685, 1995.

LI, Y.; WANG, W.; CAUFIELD, P.W. The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. **Caries Research**, v.34, p.123-132, 2000.

LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiology Reviews**, n.50, v.4, p. 353-380, Dec.1986.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, n.15, p.155-173, 1994.

MASUDA, N.; SHIMAMOTO, T.; KITAMURA, K.; SOBUE, S.; HAMADA, S. Transmission of *Streptococcus mutans* in some selected families. **Microbios**, n. 44, p. 223-232, 1985.

MATTOS-GRANER, R. O.; SMITH, D. J., KING, W. F., MAYER, M. P. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30 months-old children. **Journal of Dental Research**, n.79, p.1371-1377, 2000.

MATTOS-GRANER, R.O.; LI, Y.; CAUFIELD, P.W.; DUNCAN, M.; SMITH, D.J. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 39, p.2313-2316, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL -<http://portal.saude.gov.br/portal/saude> acesso em 11 de janeiro de 2012.

MOREIRA, M.; NOSCHANG, J.; NEIVA I.F.; CARVALHO, Y.; HIGUTI, I.H.; VICENTE, V.A . Methodological variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n.53, v.4, p. 845-849, Jul/Aug 2010.

MOSER, S. A.; MITCHELL, S. C.; RUBY, J. D.; MOMENI, S.; OSGOOD, R. C.; WHIDDON, J.; CHILDERS, N. K. Repetitive extragenic palindromic PCR for study of *Streptococcus mutans* diversity and transmission in human population. **Journal of Clinical Microbiology**, n.48, v.2, p. 599-602, 2010.

NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; VICENTE, V.A.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of fungal pathogens by rolling circle amplification (RCA) using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, n. 54, p.577–582, 2011.

NAKAI, Y.; SHINGA-ISHIHARA, C.; KAJI, M.; MORIYA, K.; MURAKAMI-YAMANAKA, K.; TAKIMURA, M. Xylitol gum and maternal transmission of mutans streptococci. **Journal of Dental Research**, n.89, v.1, p.56-60, 2010.

NIE, M.; FAN, F.; BIAN, Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a chinese population. **Caries Research**, v.36, p.161-166, 2002.

NILSSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B.P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, n.265, p. 2085–2088, 1994.

OKADA, M.; SODA, Y.; HAYASHI, F.; DOI, T.; SUZUKI, J.; MIURA, K.; KOZAI, K. PCR detection of *Streptococcus mutans* and *S. sobrinus* in dental plaque samples from Japanese pre-school children. **Journal of Medical Microbiology**, n. 51, p. 443 – 447, 2002.

PINTO, V.G. (Org.). **Saúde Bucal Coletiva**. 5. ed. São Paulo, 2008.

SAXENA, D.; CAULFIELD, P.W.; LI, Y.; BROWN, S.; SONG, J.; NORMAN, R. Genetic classification of severe early childhood caries by use of subtracted DNA fragments from *Streptococcus mutans*. **Journal of Clinical Microbiology**, n.46, v.9, 2868-2873, 2008.

SCHLOTTER, M.; LEBUHN, M.; HEULIN, T.; HARTMANN, A. Ecology and evolution of bacterial microdiversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.647-660, 2000.

SUN J., NAJAFZADEH M. J., VICENTE V., XI L., DE HOOG G. S. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. **Journal of Microbiological Methods**, n. 80, p.19–24, 2010.

TANZER, J.M. Microbiology of dental caries. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M.A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. St. Louis: Mosby Year Book, p.377-424, 1992.

TEDJOSASONGKO, U.; KOZAI, K. Initial acquisition and transmission of mutans streptococci in children at day nursery. **ASDC Journal of Dental Child**, n.69, p. 284 -288, 2002.

THORILD, I.; LINDAU, B.; TWETMAN, S. Effect of maternal use of chewing gums containing xylitol, chlorhexidine or fluoride on mutans streptococci colonization in the mothers' infant children. **Oral Health e Preventive Dentistry**, n. 1, v.1, p.53-57, 2003.

TUNG, S.K.; TENG, L.J.; VANEECHOUTTE, M.; CHEN, H.M.; CHANG, T.C. Identification of species of *Abiotrophia*, *Enterococcus*, *Granulicatella* and *Streptococcus* by sequence analyses of the ribosomal 16S-23S intergenic spacer region. **Journal of Medical Microbiology**, n.56, p.504-513, 2007.

WANG, B.; POTTER, S.J.; LIN, Y.; CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E.; SU, Y.; MA, X.; HOU, Y.; SAKSENA, N.K.. Rapid and sensitive detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus by rolling circle amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 43, p. 2339–2344, 2005.

WHO. **World Health Statistics**, 2011.
www.who.int/whosis/whostat/2011/en/index.html

WOO, P. C.; LAU, S. K.; TENG, J. L.; TSE, H.; YUEN, K. Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. **Clinical Microbiology and Infection**, n.14, p.908–934. 2008.

WURMEISTER, F. **Revolução na leitura dos genes** - Vida e Cidadania - Gazeta do Povo, 2011 www.gazetadopovo.com.br/vidaecidadania/conteudo.phtmlid

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS E/OU SUBMETIDOS

ANEXO I

ARTIGOS PUBLICADOS

845

Vol.53, n. 4: pp. 845-849, July-August 2010
ISSN 1516-8913 Printed in Brazil

BRAZILIAN ARCHIVES OF
BIOLOGY AND TECHNOLOGY

AN INTERNATIONAL JOURNAL

Methodological Variations in the Isolation of Genomic DNA from *Streptococcus* Bacteria

Mônica Moreira¹, Juliana Noschang¹, Ivana Froede Neiva¹, Yanê Carvalho², Ilma Hiroko Higuti¹ and Vânia Aparecida Vicente^{1*}

¹Departamento de Patologia Básica; Universidade Federal do Paraná; Curitiba - PR - Brasil. ²Laboratório de Parasitologia Molecular; Universidade Federal do Paraná; Curitiba - PR - Brasil

ABSTRACT

In this work, genomic DNA of *Streptococcus pyogenes*, *S. mutans* and *S. sobrinus* was isolated using two methods: either using the detergent cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at 65°C; or by applying ultrasound to a mixture of silica and celite in CTAB. The composite method that used ultrasound was the more efficient, allowing the straightforward extraction of genomic DNA from Gram-positive bacteria with good quality and reproducibility.

Key words: Key words: *Streptococcus*, DNA isolation, CTAB, ultrasound

INTRODUCTION

Pyogenic *Streptococcus* belonging to Lancefield's A, C, and G groups are pathogenic agents of a variety of human and animal diseases (Bert et al., 1997). *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus* β -hemolytic of the A group - GAS) is responsible for causing diseases such as erysipelas, pharyngotonsillitis, and scarlatina (Gonzalez et al., 2003), and some serotypes are associated with nonsuppurative complications such as post streptococcal glomerulonephritis and rheumatic fever (Edwards et al., 2003). *Streptococcus* of the Mutans group is usually considered as the main etiologic agent of dental caries. This group of microorganisms comprises seven distinct species, including *S. mutans* and *S. sobrinus*, which are most commonly associated with human diseases (Hamada and Slade, 1980; Loesche, 1986).

Advances in molecular biology have provided techniques based on PCR (polymerase chain reaction) and DNA sequencing that allow for improvement in the diagnosis and monitoring of diseases caused by the microorganisms, as well as in epidemiological and transmission studies. Bacterial DNA can be amplified by PCR and then sequenced to provide bacterial identification. An efficient DNA extraction method that results in pure, high quality extracts is important for the success of PCR and subsequent DNA sequencing (Smith et al., 2003), as well as other methods used in molecular biology. The demand for molecular diagnostic tests in medical and oral microbiology underscores the need for efficient methods of DNA extraction.

In order to be applicable in laboratory practices, the DNA extraction process should preferably be inexpensive, safe, simple, reproducible, and

* Author for correspondence: vicente@ufpr.br

adequate to the studied samples. The cell wall of Gram-positive bacteria can be broken by the use of enzymes that degrade peptidoglycans such as the lysozyme and mutanolysin present in the commercial kits (Yano et al., 2002; Old et al., 2006), which cause the method to be expensive. The use of cheaper alternative methods is not always appropriated given the difficulty in breaking the cell wall when some reagents are used, such as phenol-ether (Rantakokko-Jalava and Jalava, 2002).

In this sense, bacterial DNA can be extracted from sera by boiling without using any toxic reagent, overcoming the use of expensive commercial kits for DNA purification (Mayoral et al., 2005). Some researchers have already used cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) with good results and considerable cost reduction (Doyle and Doyle, 1987; Petersen and Scheie, 2000; Igarashi et al., 2001), at times being combined with sodium dodecyl sulfate (Dellaporta et al., 1983). In 1956, studies by Slade and Vetter have shown that physical methods such as the use of ultrasound or agitation using glass beads facilitates breaching the cell wall.

The goal of the present study was to assess the efficacy and applicability in daily laboratory routine of two methods for the extraction of Gram-positive bacterial genomic DNA, such as *S. pyogenes*, *S. mutans*, and *S. sobrinus*.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Forty isolates of *S. pyogenes* collected from the oropharynx of employees of a food processing company in Curitiba, State of Paraná, where an outbreak of streptococcal pharyngitis occurred in 2004, and 64 isolates of *Streptococcus* of the Mutans group (*S. mutans* and *S. sobrinus*) obtained from saliva samples of 40 individuals belonging to 9 underprivileged families from the suburbs of Curitiba, PR. All *Streptococcus* isolates were cultivated in brain heart infusion (BHI) broth and incubated at 37°C for 24h. The obtained cultures had approximately 10^8 cells, according to MacFarland's scale.

Total DNA extraction

1. Protocol using CTAB according to Petersen and Scheie (2000), modified. The culture was centrifuged at 49000 g for 2 min, and the

supernatant was discarded. The bacterial cells were washed twice using a TRIS-EDTA (TE) buffer. A volume of 600 µL of CTAB was added to the precipitate, and the entire solution was kept in a heat bath at 65°C for 30 min. After the addition of 800 µL of a chloroform/isoamyl alcohol solution (CIA, 24:1, v/v), the mix was centrifuged at 49000 g for 7 min. A total of 450 µL of the supernatant was removed and transferred to another vial, to which an equal amount (450 µL) of CIA was added, and the solution was homogenized. After centrifuging at 49000 g for 7 min, 300 µL of the supernatant were transferred to another vial, to which 2.5 parts of cold 96% ethanol were added. The vial was left overnight at -20°C. The final step was repeated with cold 70% ethanol, the mix was centrifuged at 49000 g for 7 min, and the vial was left open in a wind tunnel chamber to dry the precipitate. The DNA was then suspended in 50 µL of ultra pure water and stored at -4°C.

2. Protocol using ultrasound combined with silica and celite in CTAB, according to De Hoog et al. (2004), modified: The samples were previously inoculated in BHI broth and incubated for 24h at 36°C. After that the cultures were centrifuged at 49000 g for 2 min and the precipitate was transferred to a vial containing a mixture of powdered silica (silica gel, Merk) and celite (2:1) for maceration in 600µL of CTAB buffer. Three 30s pulses of ultrasound (power 70) were applied to it, with 30s intervals between each pulse, with the vial in ice, using an ultrasonic cell disruptor (Unique®). After this treatment, 400 µL of CTAB were added to the samples, which were incubated on a heat bath at 65°C for 10 min. After reaching room temperature, 1000 µL of a CIA solution were added to the mix, which was centrifuged at 49000 g for 7 min. The supernatant was transferred to another vial, to which an additional 1000 µL of CIA was added, and was centrifuged again. Approximately 2000 µL of cold 96% ethanol were added to the supernatant, and the vial was incubated at -20°C overnight for the precipitation of the nucleic acids. After this period, the vial was centrifuged at 49000 g for 7 min. The supernatant was discarded and the precipitate was washed with cold 70% ethanol and centrifuged at 49000 g for 7 min. The ethanol was removed and the tubes remained opened in a wind tunnel chamber until the precipitate was completely dry. The precipitate was resuspended on 50µL of ultra

1996; Jose and Brahmadathan, 2006). Both methods were shown to be efficient, given that the extracted DNA was used in different molecular

methods. However, these methods use enzymes, which increases the costs in comparison with the methods used in the present study.

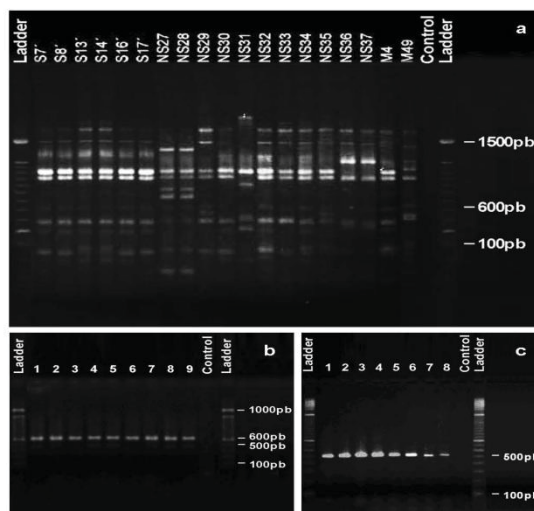


Figure 2 - Representative gel pictures of the bacterial genomic DNA amplified obtained by the method of ultrasound in association with the mixture of silica and celite in CTAB: a) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profile of Group A *Streptococcus* (GAS); b) IGS region amplification profile obtained from genomic DNA of *S. mutans* strains (1-9) c) Sequencing reaction of glycosyltransferase gene (GTS- β) of *S. mutans* strains (1-8).

The advantage of using the physical method as pretreatment without heating or freezing/thawing not even the later use of enzymes, is its simplicity and low cost. In addition, it is useful to standardize these methods for easy and rapid extraction of DNA directly from the isolated colonies of GAS strains and *Streptococcus* of the Mutans group cultivated in liquid media, facilitating molecular studies (Moreira et al., 2007).

The present results supported the assumption that the method using ultrasound with a mixture of silica and celite in CTAB had good reproducibility, was straightforward to execute, and allowed the extraction of high-quality DNA from Gram-positive cells, and, thus, could be used in molecular biology laboratories.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Prof Dr Walter Boeger for technical support.

RESUMO

O gênero *Streptococcus* encontra-se amplamente distribuído na natureza e algumas espécies constituem a microbiota humana da cavidade bucal, como *Streptococcus pyogenes*, que pode estar associado a importantes doenças humanas, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, relacionados à cárie dental. O DNA genômico destas três espécies foi isolado utilizando-se dois

métodos, o primeiro utilizando o detergente brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) à 65°C e outro associando ultra-som a uma mistura de sílica e celite em CTAB. O método que possibilitou a extração do DNA genômico das bactérias Gram positivas, com qualidade, boa reprodutibilidade fácil execução foi aquele que utilizou ultra-som associado à sílica e celite em CTAB.

REFERENCES

- Beall, B.; Facklam, R. and Thompson, T. (1996), Sequencing *emm*-specific PCR products for routine and accurate typing of group A streptococci. *Journal of Clinical Microbiology*, **4** (34), 953-958
- Bert, F.; Branger, C.; Lambert-Zechovsky, N. (1997), Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyogenic streptococci. *Curr Microbiol.*, **34**, 226-229
- De Hoog, G.S.; Attili-Angelis, D.; Vicente, V. A.; Van Den Ende, A. H.; Queiroz-Telles, F. (2004), Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* species. *Med Mycol.*, **5**, 405-416
- Dellaporta, S. L.; Wood, J.; Hicks, J.B. (1983), A plant DNA miniprep: versão II. *Plant Mol Biol Rep.*, **1**, 19-21
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. (1987), A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull.*, **19**, 11-15
- Edwards, M. L.; Fagan, P. K.; Smith-Vaughan, H.; Currie, B. J.; Sriprakash, K. S. (2003), Strains of *Streptococcus pyogenes* from severe invasive infections bind Hep2 and HaCaT cells more avidly than strains from uncomplicated infections. *J Clin Microbiol.*, **41**, 3936-3938
- González-Rey, C.; Belin, A. M.; Jörbeck, H.; Norman, M.; Krovacek, K.; Henriques, B.; Källénus, G.; Svenson, S. B. (2003), RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, **26**, 25-35
- Hamada, S.; Slade, H. D. (1980), Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.*, **44**, 331-384
- Igarashi, T.; Yano, Y.; Yamamoto, A.; Sasa, R.; Goto, N. (2001), Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe. *Letters in Applied Microbiology*, **32**, 394-397
- Jose, J.J.M. and Brahmadatah, K.N. (2006), Evaluation of simplified dna extraction methods for *emm* typing of group A *Streptococci*, *Indian Journal of Medical Microbiology*, **24** (2), 127-30
- Loesche, W. J. (1986), Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.*, **50**, 353-380
- Mayoral, C.; Noroña, M.; Baroni, M.R.; Giani, R.; Zalazar, F. (2005), Evaluation of a nested-PCR assay for *Streptococcus pneumoniae* detection in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Rev Argent Microbiol.*, **37** (4), 184-188
- Moreira, M.; Vicente, V. A.; Glienke, C. (2007), Genetic variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by RAPD markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38**, 729-735
- Old, L.A.; Lowes, S.; Russel, R.R.B. (2006), Genomic variation in *Streptococcus mutans*: deletions affecting the multiple pathways of β -glucoside metabolism. *Oral Microbiol Immunol.*, **21**, 21-27
- Petersen, F.C.; Scheie, A.A. (2000), Genetic transformation in *Streptococcus mutans* requires a peptide secretion-like apparatus. *Oral Microbiol Immunol.*, **15**, 329-334
- Rantakokko-Jalava, K.; Jalava, J. (2002), Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J Clin Microbiol.*, **40**, 4211-4217
- Slade, H. D.; Vetter, J. K. (1956), Studies on *Streptococcus pyogenes*. I. Observations on the microscopical and biological aspects of the disintegration and solubilization of a type 6 strain by shaking with glass beads. *J Bacteriol.*, **71**, 236-243
- Smith, K.; Diggle, M. A.; Clarke, S. C. (2003), Comparison of commercial DNA extraction kits for extraction of bacterial genomic DNA from whole-blood samples. *J Clin Microbiol.*, **41**, 2440-2443
- Yano, A.; Kaneko, N.; Hiroshida, I.; Toshikazu, Y.; Hanada, N. (2002), Real time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, **217**, 23-30.

Received: January 21, 2008;
Revised: November 14, 2008;
Accepted: October 30, 2009.

Estratégia multidisciplinar na prevenção e controle de doenças de manifestação clínica na infância

Multidisciplinary strategy for preventing and controlling diseases which manifest themselves clinically in early childhood

Vânia Aparecida VICENTE¹
 Mônica MOREIRA¹
 Eduardo Luis ZARDO¹
 Samarina de França BRAGA¹
 Adriana Oliveira COSTA¹
 Ivana Froede NEIVA²
 Fabian Calixto FRAIZ³
 Ilma Hiroko HIGUTI¹
 Edinara Midyan ILG⁴
 Eni Piccioni BOMPEIXE¹
 Sílvia Tiemi Makita HIGUTI¹
 José Vicente Teixeira PINTO¹

RESUMO

Objetivo

Apresentar os resultados do projeto multidisciplinar que consolidou um programa de manutenção de saúde a partir de procedimentos individuais e coletivos para o diagnóstico e prevenção de doenças na infância.

Métodos

As atividades se pautaram na análise das condições de saúde de escolares de 6 a 12 anos, pertencentes à rede municipal de ensino da região rural de Campo Largo e metropolitana de Curitiba, Paraná, Brasil. As doenças foram investigadas por meio de anamnese, exame clínico, análise microbiológica de secreção orofaríngea e de saliva; além de exame parasitológico de fezes. Atividades interativas e educacionais apresentando informações sobre transmissão e diagnóstico de doenças como cárie, febre reumática e parasitoses foram realizadas envolvendo a comunidade estudantil e familiar. Os casos clínicos foram encaminhados para tratamento e acompanhamento.

Resultados

Dentre 4.837 crianças analisadas, observou-se que 81% apresentaram alto risco de desenvolver cárie dental considerando a correlação entre concentração de *Streptococcus mutans* na saliva e epidemiologia da doença. Os exames copro-parasitológicos revelaram índices de positividade de 70% em crianças de área rural e de 55% em escolares de área metropolitana. Cinco crianças foram diagnosticadas como portadoras de febre reumática.

Conclusão

A elevada ocorrência da doença cárie e parasitoses, bem como a existência de indivíduos portadores de febre reumática, demonstraram a demanda desta população por ações de promoção de saúde que visem à educação sanitária, a profilaxia e tratamento. Atividades de extensão desta natureza são de grande importância para as comunidades escolares assistidas.

Termos de indexação: Cárie dentária. Doenças parasitárias. Prevenção & Controle. Saúde bucal.

ABSTRACT

Objective

This work was conducted to present the results of a multidisciplinary project which established a health program through individual and collective procedures for the diagnosis and prevention of childhood illnesses.

Methods

The health status was evaluated of children between the ages of six and twelve in the rural district of Campo Largo and schools in metropolitan Curitiba in the state of Paraná, Brazil. Students were submitted to anamnesis and clinical examination. Samples of saliva and oropharyngeal

¹ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica. Centro Politécnico, s/n, Jd. das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil. Correspondência para / Correspondence to: VA VICENTE. E-mail: <vicente@ufpr.br>.

² Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Dentística Restauradora. Curitiba, PR, Brasil.

³ Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Estomatologia. Curitiba, PR, Brasil.

⁴ Universidade Federal do Paraná, Faculdade de Odontologia. Curitiba, PR, Brasil.

secretions were collected for microbiological analysis. In addition, fecal exams were performed to detect intestinal parasites. Information about transmission, diagnosis and prevention of dental caries, rheumatic fever and parasites was imparted to the school community by way of lectures, flyers and play activities. All clinical cases were referred for treatment and follow-up.

Results

Out of the 4,837 children analyzed, 81% were at high risk of acquiring dental caries, based on the correlation between the concentration of *Streptococcus mutans* in the saliva and the epidemiology of the disease. The parasitological tests showed that 70% of the children from the rural areas and 56% of those from metropolitan areas, were infected. Five children tested positive for rheumatic fever.

Conclusion

The high prevalence of caries, parasitic infections and the occurrence of rheumatic fever in children point to the urgency for initiatives to promote health through actions aimed at sanitary education, prophylaxis and treatment. Educational actions of this nature are of major importance to the school communities attended to.

Indexing terms: Dental caries. Parasitic diseases. Prevention & Control. Oral health.

INTRODUÇÃO

Ações de promoção de saúde e prevenção em comunidades escolares podem evitar doenças cujo custo social é extremamente oneroso; e a universidade deve se aproximar da realidade social, para cumprir seu papel na construção de uma sociedade mais justa e igualitária. Os profissionais formados devem adquirir durante a graduação uma visão integral dos eventos bio-psico-sócio culturais que podem interferir no processo saúde doença de um indivíduo ou de uma coletividade.

Para atingir este objetivo, no Brasil a partir de 1988, na Constituição, foi aprovado o conceito de indissociabilidade entre ensino-pesquisa-extensão¹. A extensão busca uma ação transformadora, com interação social e interdisciplinaridade².

Este artigo apresenta um programa de extensão de caráter multidisciplinar, voltado à comunidade escolar, envolvendo ações de prevenção e controle das doenças cárie dental, parasitoses e febre reumática, as quais são frequentes e importantes na primeira infância e idade escolar.

A cárie é uma doença microbiana que se inicia na infância e aumenta de intensidade e de prevalência conforme a idade. Dentre os diversos micro-organismos presentes na cavidade bucal o *S. mutans* tem sido apontado como agente cariogênico que contribui para o desenvolvimento progressivo de lesões cariosas, devido ao seu potencial acidogênico e acidúrico³⁻⁸. Grupos de indivíduos com alta contagem de *S. mutans* na saliva apresentam significativamente maior manifestação clínica da doença. Vários testes têm sido descritos com a finalidade de prever susceptibilidade individual ou identificar indivíduos que precisam de medidas específicas de prevenção, ou ainda, reduzir a velocidade de progressão de cáries^{4,9-11}.

Quanto às parasitoses, as condições precárias de higiene, dificuldades econômicas e desconhecimento sobre medidas preventivas são fatores que contribuem para que as populações menos favorecidas e, em especial, as crianças, sejam mais comumente afetadas¹². Além de provocarem desnutrição, déficit de crescimento, entre outros agravantes, as infecções parasitárias também podem prejudicar o desenvolvimento físico e intelectual dos estudantes¹³.

Na faixa etária de 5 a 15 anos, a incidência de infecções de orofaringe é bastante acentuada, sendo frequente o agente etiológico *S. pyogenes*, bactéria beta hemolítica pertencente ao grupo A de Lancefield. Em alguns indivíduos geneticamente predispostos ocorre uma complicação inflamatória sistêmica, não supurativa e autoimune, denominada febre reumática¹⁴⁻¹⁵. A prevenção da febre reumática é um desafio para as autoridades sanitárias, uma vez que as sequelas relacionadas a esta doença são de extrema gravidade, tais como cardite e glomerulonefrite, em alguns casos levando o paciente à insuficiência renal e cardíaca.

Em países onde a renda *per capita* é mal distribuída, uma grande parcela da população habita áreas de condições sanitárias precárias, principalmente nas periferias das grandes cidades e áreas rurais e frequentemente apresenta índices maiores de cárie e parasitoses. Devido à distância do centro urbano ou pelo próprio contexto de exclusão social, estas populações frequentemente não são atendidas por programas de promoção de saúde implementados por órgãos públicos. Portanto, a atuação de projetos de extensão universitária nestas áreas pode contribuir para minimizar problemas de saúde decorrentes da ausência de ações profiláticas.

Sendo assim, este trabalho visou apresentar os resultados de um projeto de extensão que tem por objetivo geral identificar as condições de saúde dos escolares da

Rede Municipal de Ensino das regiões rural de Campo Largo e metropolitana de Curitiba, Paraná. As diferentes frentes de ação do projeto envolveram o diagnóstico e prevenção das doenças cárie, enteroparasitoses e febre reumática, por meio de um programa de manutenção da saúde, com procedimentos preventivos individuais e coletivos, além de atividades educativas.

MÉTODOS

Público alvo

O projeto assistiu 4 837 crianças na faixa etária de 6 a 12 anos, durante o período de março de 1998 a julho de 2008, regularmente matriculadas em escolas do Município de Campo Largo e Região Metropolitana de Curitiba (Escola Municipal Almêde Baridotti Galdino, Escola Municipal Bortolo Lovato e Escola Rural de São Pedro). Como critério para inclusão no Projeto Multidisciplinar, foi necessário o preenchimento, pelos pais dos escolares, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, devidamente regulamentado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e aprovado sob o n. CEP/SD 085.51 SI 048/04-06.

Avaliação da prevalência da cárie por meio da concentração da bactéria *S. mutans* na saliva e histórico clínico da doença

Amostras de saliva foram coletadas, homogeneizadas em água peptonada e cultivadas em meio Ágar Mitis Salivarius (MSBS) acrescido de sacarose e bacitracina¹⁶ sob microaerofilia a 37°C por 48 horas. Após o cultivo foi estimado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) e comparadas frente a um padrão de crescimento bacteriano, determinando as crianças de baixa (0 - 1.000 UFC/ml de saliva), média (1.000 - 10.000 UFC/ml de saliva) e alta (>10.000 UFC/ml de saliva) prevalência de *S. mutans*, segundo Vicente et al.¹⁷. A análise da micromorfologia foi realizada após coloração pelo método Gram (Figura 1). Os isolados caracterizados morfolologicamente e bioquimicamente como *S. mutans* foram estocados em freezer a -80°C, para posterior estudo de variabilidade genética e fatores de virulência dos diversos sorotipos.

A análise da experiência de cárie foi feita no ambiente escolar, com luz natural e espátula de madeira, utilizando o Índice CPO-D (índice que considera os dentes permanentes cariados, perdidos por cárie e obturados) e ceo-d (dentes decíduos cariados, perdidos por cárie ou obturados), utilizando como critério de definição de cárie

a presença de cavidade cariada no elemento dental¹⁸. O exame clínico foi realizado por cirurgiões-dentistas, professores e acadêmicos do Curso de Odontologia da UFPR, devidamente calibrados a cada início de ano utilizando como critério a reprodutibilidade entre os examinadores acima de 90%, considerando uma amostragem de 20 crianças. As crianças com cinco ou mais dentes cariados, obturados ou perdidos por cárie foram classificadas como alta experiência de cárie, e as crianças entre 0 e 4 foram classificadas como baixa e média experiência de cárie¹⁷.

Após a realização da análise microbiológica da saliva e exames clínicos, os dados eram avaliados estatisticamente por meio de correlação bisserial por ponto/r-bisserial¹⁹ e os resultados utilizados como parâmetro para o estabelecimento do risco à doença. As crianças foram divididas em grupos com base no histórico clínico e risco biológico.

Em seguida, um programa de promoção de saúde bucal diferenciado para cada grupo foi aplicado. Técnicas de higienização bucal e medidas profiláticas foram adotadas para todos os escolares. A adequação do meio bucal foi realizada de acordo com o grupo de risco. Os resultados foram levados à comunidade para reforçar a existência do agente etiológico na saliva e realizar atividades educativas e profiláticas.

Diagnóstico, prevenção e controle de parasitoses

A partir de 2005, em atenção a uma demanda identificada pelo projeto nas comunidades, foi inserida a temática de parasitoses, com propostas de diagnóstico e prevenção. Para o diagnóstico das parasitoses, foi solicitado aos escolares o fornecimento de material fecal em frascos apropriados, após o repasse de instruções para os responsáveis pela criança. O processamento das amostras foi realizado pelos métodos de sedimentação espontânea (Hoffmann, Pons e Janer) e flutuação em solução de sulfato de zinco a 33% (Método de Faust)²⁰. Os casos positivos foram encaminhados para tratamento na Unidade de Saúde local. Anualmente acadêmicos participantes do projeto realizaram reuniões para estabelecer estratégias de ação sobre a temática parasitose, incluindo a realização de palestras e a elaboração de folhetos explicativos, com informações sobre os parasitos, de acordo com a necessidade da comunidade escolar.

Diagnóstico, prevenção e controle da febre reumática

Em 2006, foi iniciada a prevenção e controle da febre reumática nas escolas atendidas. Inicialmente, alunos e funcionários foram submetidos à anamnese, e

coleta de secreção de orofaringe foi realizada nas crianças que apresentavam sintomas de tonsilite. Nos casos bacteriológicos positivos para *Streptococcus pyogenes*, foi coletada uma amostra de sangue para as provas sorológicas antiestreptolisina O (ASO) e Proteína C Reativa (CRP)²¹. Os indivíduos que apresentaram sorologia positiva foram encaminhados à Unidade de Saúde local para avaliação e quando necessário a antibioticoterapia preventiva foi realizada.

Programa de manutenção de saúde e atividades educativas

Palestras de orientação para os pais e professores foram desenvolvidas anualmente na forma de oficinas, normalmente realizadas ao final do segundo semestre, visando a modificação do entendimento quanto à prevenção e controle das diferentes doenças. Durante estes eventos, os resultados foram apresentados à comunidade escolar e familiares. Além disto, quando necessário, foi realizado um atendimento individual visando orientação para o tratamento e controle profilático. Atividades recreativas e interativas foram consideradas prioritárias na prevenção e foram realizadas sob a supervisão dos professores e alunos da UFPR.

RESULTADOS

Na avaliação da prevalência da doença cárie, durante o período do projeto foram avaliadas 4 837 crianças, observou-se em médias anuais que a maioria das crianças analisadas (81%) apresentaram alta concentração de *S. mutans* na saliva (acima de 10.000 UFC/ml de saliva). E em relação ao índice de experiência de cárie, verificou-se que 73% das crianças apresentaram alta prevalência da doença (cinco ou mais dentes cariados, obturados ou perdidos por cárie). As análises estatísticas¹⁹ comprovaram a existência de uma correlação positiva entre histórico de cárie, prevalência de *S. mutans* e presença de lesões de cárie ativa.

Sendo assim, a partir destes resultados um programa de manutenção em saúde bucal foi implantado, com execução de procedimentos individuais através da adequação do meio bucal. As crianças identificadas com alto risco ao desenvolvimento da doença foram acompanhadas de forma diferenciada com selamento de cavidades e de superfícies dentais suscetíveis, restaurações provisórias quando necessário, e aplicação tópica de flúor. Os casos de maior complexidade foram encaminhados para

Unidades de Saúde próximas às escolas e ou para a clínica de odontopediatria da Universidade Federal do Paraná. Além disso, atividades de caráter coletivo como controle do biofilme dental, orientações sobre higiene bucal, criação do escovódromo nas escolas com rotina de escovação e atividades recreativas (Figura 2) foram realizadas. Após a adequação do meio bucal as crianças eram monitoradas por meio das fichas individuais e de exames clínicos anuais.

Com relação à temática de parasitoses, os exames parasitológicos de fezes realizados em 255 crianças nas três escolas avaliadas, demonstraram uma média geral de infecção de 58,4%. Os helmintos mais encontrados foram *Ascaris lumbricoides* (13,7%), *Trichuris trichiura* (6,3%) e *Enterobius vermicularis* (2,4%). Quanto aos protozoários potencialmente patogênicos, os mais prevalentes foram *Giardia duodenalis* (21,2%) e *Entamoeba histolytica* (4,7%), enquanto os não patogênicos *Entamoeba coli*, *Endolimax nana* e *Iodamoeba butschlii*, apareceram, em 18%, 7% e 1,6% dos exames, respectivamente. Embora não causem sintomas, a presença destes últimos indica contaminação ambiental (solo, água) com fezes de humanos¹³.

Avaliando os dados por escola, somente na Escola Rural de São Pedro, em que a totalidade das crianças foi examinada, 70% delas encontravam-se infectadas por protozoários ou helmintos. Os índices de parasitoses para a Escola Almêde Baridoti Galdino e para a escola Bortolo Lovato foram semelhantes (54,9 e 56,4%, respectivamente).

Entre 2006 e 2008, culturas de secreção de orofaringe foram realizadas em 120 crianças, selecionadas através de anamnese prévia. Neste período, cinco crianças foram detectadas como portadoras de *S. pyogenes* no material de orofaringe e apresentaram sorologia positiva para Proteína-C Reativa e Antiestreptolisina-O e foram encaminhados para avaliação na Unidade de Saúde local.

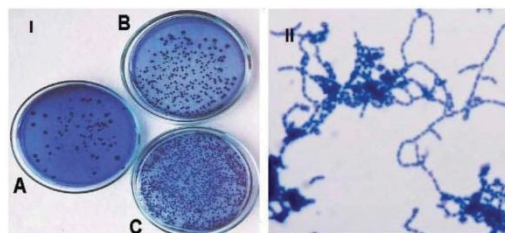


Figura 1. I) Colônias de *S. mutans* crescidas em Agar Mitis Salivarius; critérios adicionais utilizados para estabelecimento do risco individual ao desenvolvimento e controle da doença cárie. A: 0 - 1.000UFC/ml (baixo); B: 1.000 - 10.000 UFC/ml (médio); C: >10.000 UFC/ml (alto); II) Micromorfologia, coloração pelo método Gram.



Figura 2. Intervenções coletivas e individuais para diagnóstico e prevenção de cárie, parasitoses e febre reumática. A e B) Oficinas e palestras educativas; C) Orientação sobre higiene bucal e escovação; D) Adequação do meio bucal realizada no Odontomóvel da UFPR; E) Atividade sobre parasitoses; F) Demonstração microscópica de parasitos *S. mutans*.

DISCUSSÃO

Todas as doenças abordadas por este projeto têm em comum os fatores da ultra- estrutura social, econômica e cultural. Elas apresentam, ainda, outro elo, todas podem ser controladas de forma profilática a partir de ações com baixa complexidade.

Em vários países, a cárie é uma doença grave, que pode causar problemas significativos na população pré-escolar. Ela constitui uma fonte de custos sociais consideráveis. Um conhecimento maior sobre a etiologia e a identificação dos indivíduos de risco pode ajudar a dirigir os serviços preventivos para as crianças mais necessitadas²². O Brasil teve um considerável avanço na última década, na implantação de políticas de prevenção visando o controle de cáries em crianças, entretanto existe ainda uma grande necessidade de cuidados odontológicos nesta faixa etária²³.

No presente projeto, as crianças que apresentavam histórico de cárie frequentemente portavam lesões de cárie ativa, confirmando a relação entre o risco microbiológico e a prevalência da doença. No entanto, salienta-se que alta ou média prevalência de cárie pode ser observada também em crianças com baixa concentração de *S. mutans* na saliva, isto pode ser justificado pelo fato de a cárie ser uma doença multifatorial, onde os fatores endógenos do hospedeiro como fluxo e capacidade tampão da saliva, presença de imunoglobulinas salivares, bem como os fatores exógenos como dieta e higiene bucal, estariam interagindo para o estabelecimento da doença⁸.

Além disso, variações nos fatores de virulência de *S. mutans* também podem influenciar o desenvolvimento da doença²⁴. Tais como a acidogenicidade, aciduricidade, e a síntese de glicanos insolúveis (GI) a partir da sacarose,

estão relacionados à capacidade do *S. mutans* em colonizar as superfícies dentais e induzir a cárie^{11,25}. Mais estudos sobre este aspecto serão importantes para a compreensão dos mecanismos pelos quais esta bactéria coloniza os dentes e induz à cárie dental, possibilitando assim o desenvolvimento de novas estratégias preventivas e de identificação de indivíduos de risco²⁶⁻²⁸.

A bactéria *S. mutans* é uma das espécies da microbiota bucal, associada com cáries precoces na infância, presente em crianças pré-escolares²⁸. De acordo com Milgrom et al.⁶, um dos melhores indicadores do desenvolvimento de cárie é a presença de *S. mutans* na saliva. Os níveis desta bactéria fornecem informações valiosas sobre o futuro desenvolvimento e gravidade dos padrões da cárie dentária. Um estudo longitudinal revelou que crianças em idade pré-escolar com altos níveis de *S. mutans* apresentaram prevalência significativamente mais alta (87%) de cárie de dentina em fósulas e fissuras, e em dentes anteriores, do que aquelas com baixos níveis salivares iniciais⁵.

Testes microbianos para avaliação de risco de cárie não são amplamente usados na prática devido ao custo e à disponibilidade limitada²². Porém, sabe-se que a concentração de *S. mutans* na saliva representa um parâmetro promissor para este tipo de avaliação, justificando-se assim a sua aplicação em trabalhos de natureza multidisciplinar como o presentemente relatado. Destaca-se ainda que, devido à natureza multifatorial da cárie, sua profilaxia só será possível se o profissional e ou acadêmico adotar medidas que controlem um ou mais fatores de risco. Do contrário, as intervenções não seriam de natureza preventiva, mas sim curativas e reabilitadoras somente.

Em geral, métodos microbiológicos de amostragem são rápidos, fáceis de realizar e bem tolerados pelos indivíduos¹⁰. É necessário demonstrar os benefícios de testes microbianos nas estratégias dirigidas à prevenção da cárie dentária²², os quais podem representar um instrumento útil para melhorar a capacidade de investigação do risco de cárie dentária e orientar ações profiláticas⁵⁻¹⁰.

Buscando atender outras demandas de promoção de saúde, no que diz respeito a doenças de ocorrência em idade escolar, foram realizadas atividades de diagnóstico e prevenção de parasitoses nas escolas atendidas pelo projeto. A elevada prevalência de parasitos observada (acima de 50%) pode estar relacionada com a dificuldade de acesso à estrutura sanitária adequada por esta população. De fato, ao avaliar a prevalência por escola, aquela de região rural, onde não havia sistema de tratamento de esgoto e água, foi a que apresentou maior percentagem de crianças positivas para parasitos (70%). Também o

desconhecimento e a falta de adoção de medidas básicas de higiene, condição predominante na faixa etária infantil, podem justificar os índices elevados, mesmo nas escolas de área urbana periférica. Por este motivo, as intervenções educativas por meio de palestras, fornecimento de folhetos e atividades lúdicas são tão relevantes quanto o diagnóstico e encaminhamento para tratamento das infecções.

Na temática da febre reumática, também incluída no projeto, foi possível identificar cinco crianças portadoras, que passaram a receber antibioticoterapia profilática. Com relação aos casos confirmados de febre reumática, a abordagem deste tema no projeto foi de grande importância considerando a gravidade das complicações desta doença¹⁵. Além disto, por meio das palestras, foi possível conscientizar os pais sobre as complicações decorrentes das tonsilites bacterianas causadas pelo *S. pyogenes*, ressaltando a necessidade de exames médicos e alertando sobre os riscos da automedicação.

Com uma abordagem multidisciplinar, o presente projeto buscou intervir de forma positiva nas comunidades escolares atendidas, as quais se localizam em áreas periféricas ou rurais. Uma delas, a Escola Rural de São Pedro, na região Rural de Campo Largo, a 3 horas do Centro de Curitiba, sendo 2/3 deste caminho constituído por estrada de terra. Nesta localidade, as condições precárias de infraestrutura sanitária são evidentes. Mesmo nas escolas, localizadas em áreas urbanas periféricas constatou-se a carência de ações de promoção de saúde. Tais condições são diferentes da conhecida pela maioria dos acadêmicos participantes do projeto, matriculados nos cursos de área biológica da Universidade Federal do Paraná. É comum que estes acadêmicos tenham acesso a uma formação elitizada e preparada para um mercado de trabalho quase sempre desvinculado das demandas sociais das classes desfavorecidas. Neste trabalho, o atendimento às questões de saúde bucal, enteroparasitoses e febre reumática proporcionou aos acadêmicos a oportunidade de executarem técnicas diretamente associadas à sua profissão, além de um contato com a realidade das comunidades mais carentes, criando uma filosofia, em termos de saúde pública, na formação dos acadêmicos.

CONCLUSÃO

Este projeto de extensão multidisciplinar permitiu a vivência de uma ação transformadora que buscou impacto positivo na comunidade e na universidade, ampliando a experiência, dos acadêmicos e professores,

na interdisciplinaridade e na interação com a sociedade, demonstrando também que a prevenção baseada no risco biológico é possível e de fundamental importância.

A prevenção mostrou-se relevante na identificação precoce do risco à cárie, permitindo assim, adotar medidas profiláticas que possibilitaram a redução de atividade ou até mesmo a ausência da doença em crianças com alto risco microbiológico.

Os altos índices de infecções parasitárias encontrados refletiram a dificuldade de acesso a saneamento básico, a diagnóstico apropriado e a informações sobre medidas de prevenção. O diagnóstico precoce da febre reumática é de suma importância para evitar as complicações da doença.

O projeto proporcionou, além da promoção de saúde nas comunidades atendidas, a consolidação e ampliação do conhecimento dos acadêmicos e professores da Universidade Federal do Paraná envolvidos, por meio da interação com a comunidade e do contato com seus questionamentos e demandas sobre os temas propostos.

Agradecimentos

O apoio financeiro do MEC/SEu, Fundo de Desenvolvimento Acadêmico (FDA/UFPR), Pró-Reitoria de Extensão e Cultura (PROEC/UFPR) e Fundação Araucária; assim como a disponibilidade da comunidade escolar das escolas: Escola Municipal Almêde Baridotti Galdino, Escola Municipal Bortolo Lovato e Escola Rural de São Pedro.

Colaboradores

VA VICENTE foi responsável pelo planejamento, avaliação, coordenação do projeto e redação do artigo. M MOREIRA e FC FRAIZ coordenaram as atividades envolvendo ações individuais e coletivas para o controle da doença cárie e participaram da redação do artigo. EL ZARDO, SF BRAGA realizaram a análise microbiológica da saliva, exames clínicos e anamnese e redação do artigo. AO COSTA avaliou a frequência de enteroparasitoses e participou da redação do artigo. IF NEIVA realizou a análise microbiológica da saliva, exames clínicos e anamnese, coordenou as atividades envolvendo ações individuais e coletivas para o controle da doença cárie e participou da redação do artigo. IH HIGUTI foi responsável pela investigação dos indivíduos portadores de febre reumática e redação do artigo. EM ILG, EP BOMPEIXE, STM HIGUTI e JVT PINTO colaboraram na inclusão de resultados, discussão, revisão dos dados e redação do artigo.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Constituição (1988). Constituição da República Federativa do Brasil [citado 2009 Out 6]. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constitui%C3%A7ao.htm>.
2. Brasil. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Superior. Fórum de Pró-Reitores de Extensão das Universidades Públicas Brasileiras. Extensão universitária: organização e sistematização. Belo Horizonte: Coopmed; 2007.
3. Duchin S, van Houte J. Colonization of teeth in human by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. *Infect Immun*. 1978;20(1):120-5.
4. Koga CY, Unterkircher CS, Fantinato V, Shimizu MT, Jorge AOC. Testes de atividade de cárie: avaliação de diferentes métodos. *RGO - Rev Gaúcha Odontol*. 1995;43(3):141-4.
5. Thibodeau EA, O'Sullivan DM. Salivary *Streptococcus mutans* and dental caries patterns in pre-school children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1996;24(3):164-8.
6. Milgron P, Riedy CA, Weinstein P, Tanner AC, Manibusan L, Bruss J. Dental caries and its relationship to bacterial infection, hipoplasia, diet, and oral hygiene in 6-to36-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000;28(4):295-306.
7. Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res*. 2001;35(6):397-406.
8. Moreira M, Vicente VA, Glienke C. Genetic variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by RAPD markers. *Braz J Microbiol*. 2007;38:729-35.
9. Holbrook WP, Soet JJ, Graaff J. Prediction of dental caries in pre-school children. *Caries Res*. 1993;27(5):424-30.
10. Barsamian-Wunsch P, Park JH, Watson MR, Tinanoff N, Minah GE. Microbiological screening for cariogenic bacteria in children 9 to 36 months of age. *Pediatr Dent*. 2004;26(3):231-9.
11. Barbieri DSAV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*. 2007;38:624-31.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de atenção à saúde da criança indígena brasileira. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
13. Rey L. Bases da parasitologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.
14. Guilherme L, Weidebach W, Kiss MH, Snitkowski R, Kalil J. Association of human leucocyte class II antigens with rheumatic fever. *Circulation*. 1991;83(6):1995-8.
15. AHA. Guidelines for diagnosis of rheumatic fever - Jones criteria, 1992 update. *JAMA*. 1992;268(15):2060-73.
16. Gold OG, Jordan HV, van Houte JA. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1973;18:1357-64.
17. Vicente VA, Poletto MM, Neiva IF, Pinto JVT, Braga SF, Moreira M, et al. Relação entre a prevalência da doença cárie e risco microbiológico. *Ciênc Odontol Bras*. 2008;11(2):44-8.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Programa de Saúde bucal. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: cárie dental. Brasília: Ministério da Saúde; 1996.
19. Kraemer HC. *Encyclopaedia of statistical sciences*. New York: Wiley; 1982.
20. Martins MT, Pessoa GVA, Sanchez OS, Sato MIZ, Monteiro CK, Coimbra CA, et al. Isolamento de salmonella no ambiente aquático: significado sanitário. *Rev Microbiol*. 1988;19(1):29-39.
21. Koneman EW, Allen SD, Janda WM. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5ª ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica; 2001.
22. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM. Current understanding of the epidemiology, mechanisms, and prevention of dental caries in preschool children. *Pediatr Dent*. 2002;24(6):543-51.
23. Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
24. Lemos JA, Burne RA. A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiol*. 2008;154:3247-55.
25. Biswas S, Biswas I. Regulation of the glucosyltransferase (gtfB) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*. 2006;188(3):988-98.
26. Bowden GH. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(1):76-81.
27. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33:248-55.
28. Saxena D, Caufield PW, Li Y, Brown S, Song J, Norman R. Genetic classification of severe early childhood caries by use of subtracted DNA fragments from *Streptococcus mutans*. *J Clin Microbiol*. 2008;46(9):2868-73.

Recebido em: 15/1/2010

Aprovado em: 1/4/2010

ANEXO II
ARTIGO SUBMETIDO
REVISTA ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

Using molecular markers to assess *Streptococcus mutans* variability and the biological risk for caries during childhood

Authors: Moreira, M¹; Neiva, IF¹; Klisiowicz, DR²; Souza, RLR³; Vicente, VA^{1,2*}

¹ Postgraduate Program in Bioprocesses and Biotechnology of the Federal University of Paraná (Universidade Federal do Paraná) – UFPR;

² Postgraduate Program in Microbiology, Parasitology and Pathology of UFPR.

³ Postgraduate Program in Genetics of UFPR

Abstract

Objective: The aim of the present study was to characterize the genetic variability of *Streptococcus mutans* isolates and to correlate this variability with different colonization profiles observed during dental caries in a sample of children.

Design: *S. mutans* samples were isolated from the saliva of 30 children with varying histories of dental caries, and they were characterized according to morphological and biochemical markers and the sequences of their 16S-23S intergenic spacer region. The genetic variability of the isolates was first assessed using RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers. Next, the isolates were differentiated by sequencing a specific region of the gene encoding the enzyme beta-glucosyltransferase (*gtfB*).

Results: Characterization using RAPD markers uncovered significant genetic variability among the samples and indicated the existence of clusters, which allowed us to reconstruct both the origin and clinical history of the disease. By sequencing the 16S-23S intergenic region, we found that all of the isolates belonged to the species *S. mutans*. Based on the genetic similarity of the isolates and pattern of amino acid variations identified by partial sequencing of the *gtfB* gene, base-pair changes were identified that correlated with different virulence

patterns among the isolates.

Conclusion: The partial sequencing of the *gtfB* gene can be a useful tool for elucidating the colonization patterns of *S. mutans*. As amino acid variations are likely to be correlated with differences in biological risk, molecular characterization, such as that described in this paper, could be the key for assessing the development of dental caries in children.

Keywords: *Streptococcus mutans*; caries; RAPD; intergenic region; *gtfB*

***Corresponding author:** vicente@ufpr.br, Area of Biological Sciences / PO Box 19020 CEP 81.531-980, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil,
Telephone: 55 41 3361.1697, Fax: 55 41 3266.2042, Website:
<http://patologia.bio.ufpr>

Introduction

Caries is an infectious and transmissible disease associated with bacterial colonization of dental surfaces.¹⁻³ Due to its multifactorial nature and microbial origin, the severity and prevalence of caries can be greatly affected by the endogenous conditions within each host individual.⁴⁻⁶

Several studies have demonstrated that *Streptococcus mutans* is associated with dental caries in humans, and the risk of developing caries is related to the bacterial load of the saliva, as well as other factors, such as diet.⁴⁻⁷ *S. mutans* is the key contributor to the formation of polysaccharide-based extracellular matrices in dental biofilms.⁸ Glucosyltransferases synthesize exopolysaccharides, which are glucans that promote the accumulation of microorganisms at specific sites on dental surfaces, and glucosyltransferases become enzymatically active when exposed to dietary sucrose.

S. mutans is widely distributed not only among populations with a moderate-to-high incidence of caries⁹ but also among populations with little or no incidence of the disease,¹⁰ which suggests that colonization by this microorganism alone is not sufficient for the development of caries.⁹ Therefore, the presence of *S. mutans* in individuals with low caries experiences could be explained by differences in bacterial virulence factors¹¹ or endogenous factors within the host populations.

S. mutans is only one member of the indigenous oral biota that plays roles in “severe early childhood caries” (S-ECC). As most humans are host to *S. mutans* but not all carriers manifest dental caries, it has been suggested that certain strains of *S. mutans* associated with S-ECC could be genetically different from strains found in caries-free individuals.¹²

Molecular markers have been used to elucidate the genetic variability among *S. mutans* isolated from saliva and other sources. RAPD (Random

Amplified Polymorphic DNA) markers have been most widely used for this purpose.¹³⁻¹⁵ In addition, IGS sequencing (e.g., sequencing of intergenic regions between the 16S and 23S rRNA genes) has been used to taxonomy studies while partial sequencing of the gene *gtfB*, which encodes the enzyme beta-glucosyltransferase, has been used to investigate enzymatic activity and virulence.¹⁶⁻¹⁷

In the present study, samples of *S. mutans* isolated from the saliva of children with varying histories of dental caries were characterized using morphological and biochemical markers, 16S-23S IGS sequencing, and RAPD markers. These isolates were further distinguished by sequencing specific regions of the *gtfB* gene to characterize the genetic variability at this locus and correlate this information with the colonization profiles of *S. mutans* observed in the children.

Materials and Methods

Case series and strains

For the present study, it was selected 44 strains of *S. mutans* isolated from the saliva of 30 children attending rural schools affiliated with the University Extension Program “Multidisciplinary strategy for the prevention and control of diseases manifesting clinically in childhood”.¹⁸ The sample of children exhibiting a range of epidemiological profiles of dental caries was initially characterized according to the DMFT (the number of permanent decayed, missing, or filled teeth) and deft (deciduous teeth) metrics. Sucrose consumption was quantified based on the frequency and amount of daily intake. The isolation of the strains and estimation of CFUs (colony-forming units) per mL of saliva were performed using Mitis Salivarius Agar.¹⁹ Based on

the biochemical evidence, as well as factors identified during the clinical interviews and examinations, the 44 *S. mutans* isolates were divided into three host groups (Table 1).

Table 1. The *S. mutans* isolates used in this study according to the clinical assessment groups

Clinical Group	Factors	Isolate	Child	Age	DMFT	deft	Caries activity
Group I	↑[Sucrose]	SM01	A	5	0	4	Yes
	↑CFU/mL	SM02	B	5	0	5	Yes
	↑Caries	SM03	C	8	0	6	Yes
		SM04	D	6	0	6	Yes
		SM05	E	12	4	--	Yes
		SM06	F	8	0	2	No
		SM07	G	4	0	5	Yes
		SM08	H(1)	11	12	--	Yes
		SM09	H (2)	11	12	--	Yes
		SM10	I	6	0	4	Yes
		SM11	J(1)	7	0	5	Yes
		SM12	J(2)	7	0	5	Yes
		SM13	J(3)	7	0	5	Yes
		SM14	K(1)	6	4	5	Yes
		SM15	K(2)	6	4	5	Yes
		SM16	L(1)	10	1	7	Yes
		SM17	L(2)	10	1	7	Yes
		SM18	M	7	1	4	Yes
Group II	↑[Sucrose]	SM19	N	6	2	4	No
	↓CFU/mL	SM20	O(1)	11	4	--	Yes
	↑Caries	SM21	O(2)	11	4	--	Yes
		SM22	P	8	0	2	No
		SM23	Q	6	0	4	Yes
		SM24	R	6	0	5	Yes
		SM25	S(1)	6	0	6	Yes
		SM26	S(2)	4	0	6	Yes
		SM27	T	4	0	2	Yes
		SM28	U	7	2	3	Yes
Group III	↑[Sucrose]	SM29	V(1)	10	0	--	No
	↓CFU/mL	SM30	V(2)	10	0	--	No
	↓Caries	SM31	W(1)	5	--	0	No
		SM32	W(2)	5	--	0	No
		SM33	X(1)	7	--	0	No
		SM34	X(2)	7	--	0	No
		SM35	X(3)	7	--	0	No
		SM36	Y(1)	6	--	0	No
		SM37	Y(2)	6	--	0	No
		SM38	Z	11	0	--	No
		SM39	α	12	0	--	No
		SM40	&(1)	9	0	1	No
		SM41	&(2)	9	0	1	No
		SM42	€(1)	7	0	1	No
		SM43	€(2)	7	0	1	No
		SM44	¥	11	2	--	No

0 to 100 CFU/mL = ↓CFU; above 100,000 CFU/mL = ↑CFU; ↑ [Sucrose] = high dietary sugar concentration; ↑ or ↓ Caries = higher or lower history of caries, respectively; each child in the studied was assigned a unique letter or symbol (A-Z and α, &, €, or ¥).

The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Paraná (Universidade Federal do Paraná - UFPR), number 085.SI 048/04-06. Informed consent was provided by the children's legal caretakers.

Extraction of DNA and analysis of RAPD markers

DNA extraction was performed according to Moreira et al.²⁰ by applying an ultrasound to a combination of silica and celite (2:1) in CTAB (cetyltrimethylammonium bromide). For the RAPD reactions, the following six oligonucleotide primers were used: OPA 2 (5' TGCCGAGCTG 3'), OPA 3 (5' AGTCAGCCAC 3'), OPA 5 (5' AGGGGTCTTG 3'), OPA 8 (5' GTGACGTAGG 3'), OPA 9 (5' GGGTAACGCC 3') and OPA 13 (5' CAGCACCCAC 3'). The PCR was performed using the conditions as described previously.¹⁴ The *S. mutans* strains ATCC 25175 and UA159 were included as reference samples during the amplifications, and the strains *S. sobrinus* ATCC 33478 and *S. pyogenes* ATCC 13540 were included as external control groups. The products resulting from the RAPD amplification were analyzed by electrophoresis through 1.6% agarose gels. An analysis of polymorphisms was performed using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA)²¹ (with an estimated Jaccard similarity coefficient) using the NTSYS 2.1 software program.²² The consistency of the clustering was verified by bootstrap analysis²³ with 10,000 re-samplings using the Bood 3.03 software program;²⁴ clusters exhibiting p values equal to or higher than 75% were considered consistent.

Amplification and sequencing of the 16S-23S intergenic region and *gtfB* gene

The 16S-23S intergenic region was amplified from the total DNA taken from the *S. mutans* isolates using primers 13BF (5' GTGAATACGTTCCCGGGCCT 3') and 6R (5' GGGTTYCCCCRTTCRGAAAT 3').²⁵ In order to sequence a region of the *gtfB* gene, the following primers were used: GTFB-F (5' ACTTACACACTTTTCGGGTGGCTTGG 3') and GTFB-R (5' CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC 3').²⁶

The sequencing reactions were composed as follows: 50 ng of PCR product purified with PEG (polyethylene glycol) according to Murphy et al;²⁷ 125 μ M each dNTP; 50 nM each primer; 0.5 μ L Big-Dye Terminator V 3.1 Cycle Sequencing kit; 0.5 μ L buffer and ultrapure water for a final volume of 10 μ L. The amplification conditions were as follows: 1 min at 96°C, followed by 35 cycles at 96°C for 10 s and 50°C for 5 s with a final elongation step at 60°C for 4 min. Following lyophilization in a SpeedVac at 60°C for 40 min, the samples were sequenced using electrophoresis in an ABI Prism 377 Sequencer (Applied Biosystems). The sequences were analyzed and corrected using the Staden Package software program²⁸ and aligned using a version of CLUSTAL-W.²⁹ In order to obtain the nucleotide and amino acid compositions and calculate the variable nucleotide distances and positions, we used the MEGA 3 software program.³⁰

Results and Discussion

Among the 30 analyzed children (Table 1), 13 exhibited high concentrations of *S. mutans* in their saliva ($> 10^5$ CFU/mL) and had significant histories of disease (both DMFT and deft), whereas 17 exhibited lower concentrations of *S. mutans* ($\sim 10^2$ CFU/mL) and mostly had only mild histories of disease. These data suggest

a positive correlation between *S. mutans* concentrations in saliva and the clinical manifestation of caries. However, among the children exhibiting low levels of colonization, one group (Group II) had dental caries, despite having low concentrations of *S. mutans* in their saliva, which suggests that differences might also exist with respect to the virulence of the isolates. Based on the amplification profiles of the RAPD markers, polymorphisms were identified among the investigated isolates, and further analysis clustered the isolates into seven groups with bootstrap values above 75% (Table 2).

Table 2. Clustering based on RAPD markers of the *S. mutans* isolates derived from saliva samples of children

Isolates	Origin	Clinical Group*	Bootstrap
SM1-SM3	Different hosts	Group I	80%
SM8-SM9	Same host	Group I	99%
SM11-SM12-SM13	Same host	Group I	83%
SM20-SM21	Same host	Group II	88%
SM32- SM33	Different hosts	Group III	80%
SM35- SM37	Siblings	Group III	88%
SM39-SM41-SM42	Different hosts	Group III	75%

* Clinical Group established by epidemiological data of dental caries, *S. mutans* concentration in saliva and sucrose intake (Table 1)

According to the polymorphisms identified by the RAPD markers, it was identified a relation between genetic groups of *S. mutans* and epidemiological data of disease (Table 2). The reference strains of *S. mutans* ATCC 25175, from National Collection of Types Cultures (NCTC) - UK, and UA 159, from Alabama Birmingham University – USA, were grouped separately from studied isolates. The clustering of isolates from different individuals, supported by high bootstrap values (Table 2), suggests that isolates can be transmitted among individuals. Such results correspond to what was reported in a study by Domejean et al.¹⁵,

that using arbitrary primers verified the presence of *S. mutans* corresponding genotypes, proving the horizontal transmission of bacteria among schoolchildren, aging between 5 and 6 years old. Besides, according to the results presented in table 2, it was verified two isolates grouping proceeding from the same individual (e.g., SM 11-13 and SM 20-21).

Furthermore, these results (Table 2) demonstrate the diversity among isolates, correlated with patterns of variation in the clinical manifestation of the disease, suggesting that each individual may exhibit unique patterns of colonization by *S. mutans* that could be due host's endogenous factors, since these individuals had a common pattern of diet, characterized by the high sucrose intake (Table 1).

According to Kreth et al,³¹ human mucosal surfaces are colonized by large numbers of bacterial species; these populations exist in a state of homeostasis and play an important role in protecting the host against invasion by exogenous pathogens. However, when this homeostasis is disrupted, indigenous flora can cause pathologies, such as dental caries and periodontal disease. Additionally, high colonization levels and a diverse range of *S. mutans* genotypes could be a consequence of frequent consumption of fermentable carbohydrates, and it is possible that the simultaneous action of multiple *S. mutans* strains with different cariogenic potentials could increase the risk of developing dental caries.³² In addition, when investigating the children oral microbiota, Crielaard et al,³³ showed that the salivary microbiota of children aged 3 to 18 years are still maturing and that multiple colonization events can occur during this time period.

Thus, isolates from different genetic groups determined by RAPD markers, were characterized by intergenic regions (16S-23S) sequencing of rDNA and identified as *S. mutans*. Based on the analyzed sequences, it was verified the

existence of genetic variability among these isolates. The isolates SM1, SM2, SM6, SM12 and SM37 exhibited a high degree of genetic similarity among them (Figure 1). The isolates SM1 and SM12 (Group I, Table 1) showed 100% of similarity and were originated from different children; this indicates the transmissibility of *S. mutans* among schoolchildren (Figure 1). This way, we can notice that the variability among the isolates, detected by the IGS sequencing (Figure 1), is not related to the virulence, but may indicate the route of transmissibility.

Strain *S. sobrinus* ATCC, which was included as an external control group, clustered at a distance from the experimental samples.

The isolates characterization by partial sequencing of the gene encoding the enzyme beta-glucosyltransferase (GtfB) was also done. According to the literature, the activity of this enzyme seems to be directly related to the adherence of *S. mutans* to dental enamel.^{8,34} Upon partial sequencing of the *gtfB* gene, five different genotypes were identified among the analyzed isolates. The nucleotide sequences differences were predicted to result in amino acid variations that could influence the patterns of virulence among the isolates. Figure 2 shows the grouping of the isolates originating in children with varying disease histories, which were clustered according to their genetic similarity identified by partial sequencing of the *gtfB* gene.

As shown in Figure 2, isolates SM1, SM2, SM6 and SM12, originated from individuals with similar disease histories (Table 1), clustered in the same group; isolates SM1 and SM12 were found to be identical with respect to the analyzed sequences, although they originated from different individuals, but with the same patterns of clinical manifestation, i.e. high caries status (Table 1). This finding suggests the existence of a similar virulence potential for these two isolates.

The genetic similarity of isolates SM20 and SM18 proceeding from individuals with different patterns of colonization, as evidenced by differences in saliva CFU/mL counts (Clinical Groups I and II, Table 1) and high disease prevalence, also suggested a similar pattern of virulence in these isolates. The isolates SM37, proceeding from a child with low concentration of *S. mutans* and without caries historic (Clinical Group III, Table 1), was grouped with the latter, indicating that both exogenous and endogenous host factors also might influence disease development.

The analyzed isolates exhibited amino acid sequence variations, which we compared with the sequences of the reference strains as previously described by Fujiwara et al.¹⁶ Strain D88657¹⁶ clustered with isolates SM18, SM20 and SM37 (Figure 2), which were similar with respect to amino acid composition in the position 36 of the enzyme (Table 3).

Table 3. Amino acid differences in the *gtfB* gene between *S. mutans* isolates and reference strains

Position		30	36	46	54	57	68	110	120	121	136	141
Isolates												
	SM1	S	A	Q	S	S	S	T	N	I	K	-
	SM2	S	L	.	-
	SM6	L	.	Y
	SM12	-
	SM18	.	V	.	.	.	N	A	.	L	.	-
	SM19	.	V	.	.	.	N	A	.	L	.	-
	SM20	.	V	.	.	.	N	.	.	L	.	-
	SM37	.	V	.	.	.	N	.	.	L	.	-
Strain <i>S. mutans</i> (25175)	ATCC	L	.	-
Fujiwara et al, 1998	D89977	L	.	-
	D88660	.	.	P	.	F	.	.	.	L	N	-
	D88657	T	V	.	I	L	.	-
	D88654	L	.	-
	D886511	L	.	-

Legend: . similar nucleotides, - insertion/deletion

Based on the results described in Table 3, amino acid positions ranging from 30 to 141 appeared to be susceptible to variation of *S. mutans* GtfB gene. According to the literature, the presence of polymorphisms in glucosyltransferase (*gfts*) genes expressed by different strains of *S. mutans*³⁵⁻³⁶ are likely to be associated with variations in specific enzymatic activity.³⁵ Alterations by the site-directed mutagenesis of a single amino acid in the catalytic domain of Gtfs are sufficient to considerably change the enzymatic activity of this protein, leading to differences in the dental surface adherence patterns for the investigated strains of *S. mutans*.³⁷

Thus, it is important to emphasize that the isolate SM6 exhibited an insertion of tyrosine at position 141, which differed from the rest of the isolates (Table 1). Such modification would be likely to influence enzymatic activity, as reports indicate that this is the most highly conserved position in GtfB due to its location within the catalytic domain.³⁷⁻³⁸ This hypothesis is consistent with the observed pattern of virulence for isolate 6, which was originated in an individual with a considerable clinical history of disease.

In addition, glucosyltransferases produced by *S. mutans* are also known to play an important role in virulence due to their effects on dental biofilms. Glucosyltransferases can be adsorbed directly onto enamel and catalyze the synthesis of glucans *in situ*; this promotes sites of avid colonization by microorganisms and helps to create an insoluble matrix of dental bacterial plaque,³⁴ which might also favor the development of disease.

The presence of groups containing children with a high clinical manifestation of disease and low indices of *S. mutans* in their saliva indicates that in addition to the endogenous and exogenous factors present in each individual, the presence of genetic

variations must also be taken into account when attempting to estimate the virulence of wild biotypes of *S. mutans*.

The present study demonstrates that partial sequencing of the gene encoding the enzyme beta-glucosyltransferase can be a useful tool for elucidating the virulence patterns of *S. mutans*. Because amino acid variations are likely to justify the differences in colonization pattern of these strains, that can reflect in biological risk of development the dental caries in these children.

Acknowledgments

The authors are grateful for the support of the UFPR, CAPES (Federal Agency of Support and Evaluation of Postgraduate Education/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPQ and the Araucaria Foundation.

References

1. Caufield PW, Griffen AL. Dental caries. An infectious and transmissible disease. *Pediatr Clin North Am* 2000;47(5):1001-1019.
2. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 2001;65(10):1028-37.
3. Berkowitz RJ. Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Paediatr Dent* 2006;28(2):106-109.

4. Tinanoff N, Kanellis MJ, Vargas CM. Dental caries in preschool children. *Pediatr Dent* 2002;24(6):543-551.
5. Barbieri DSV, Vicente VA, Fraiz FC, Lavoranti OJ, Svidzinski TIE, Pinheiro RL. Analysis of the in vitro adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Braz J Microbiol* 2007;38:624-631.
6. Phattarataratip E, Olson B, Broffitt B, Qian F, Brogden KA, Drake DR, Levy SM, Banas JA. *Streptococcus mutans* strains recovered from caries-active or caries-free individuals differ in sensitivity to host antimicrobial peptides. *Mol Oral Microbiol* 2011;26(3):187-99.
7. Gudkina J, Brinkmane A. The impact of salivary Mutans streptococci and sugar consumption on caries experience in 6-year olds and 12-year olds in Riga. *Stomatologija* 2010;12(2):56-59.
8. Koo H, Xiao J, Klein MI, Jeon JG. Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol* 2010;192(12):3024-3032.
9. Beigton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:248-255.
10. Matee MIN, Mikx FHM, De Soet JS, Maselle SY, De Graff J, Van Palenstein Helderman WH. Mutans streptococci in caries-active and caries free infants in Tanzania. *Oral Microbial Immunol* 1993;8(5):322-324.
11. Kilian M. Clonal basis of bacterial virulence. In: Shapiro S, Guggenheim B, eds. *Oral Biology at the Turn of the Century: Misconceptions, truths, challenges, and Prospects*. Basel: S. Karger AG; 1998:131-142.

12. Saxena D, Caufield PW, Li Y, Brown S, Song J, Norman R. Genetic classification of severe early childhood caries by use of subtracted DNA fragments from *Streptococcus mutans*. J Clin Microbiol 2008;46(9):2868-73.
13. Spolidorio DMP, Hofling JF, Pizzolito AC, Rosa EA, Negrini TC, Spolidorio LC. Genetic polymorphism of *Streptococcus mutans* in brazilian family members. Braz J Microbiol 2003;34:(3):213-217.
14. Moreira M, Vicente VA, Glienke C. Genetic Variability of *Streptococcus mutans* isolated from low-income families, as shown by RAPD markers, Braz J Microbiol 2007;38(4):729-735.
15. Domejean S, Zhan L, DenBesten PK, Stamper J, Boyce WT, Featherstone JD. Horizontal transmission of Mutans streptococci in children. J Dent Res 2010;89:51-55.
16. Fujiwara T, Terao Y, Hoshino T, Kawabata S, Ooshima T, Sobue S, Kimura S, Hamada S. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett 1998;161(2):331-336.
17. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48(3):195-199.
18. Vicente VA, Moreira M, Zardo EL, Braga SF, Costa AO, Neiva IF, Fraiz FC, Higuti IH, Ilg EM, Bompeixe EP, Higuti STM, Pinto JVT. Estratégia multidisciplinar na prevenção e controle de doenças de manifestação clinica na infância. [Multidisciplinary strategy for the prevention and control of diseases clinically manifesting in childhood]. RGO 2011;59(4):591-597.

19. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973;18(11):1357-1364.

20. Moreira M, Noschang J, Neiva IF, Carvalho Y, Higuti IH, Vicente VA. Methodological Variations in the isolation of genomic DNA from *Streptococcus* bacteria. Braz Arch Biol Technol 2010;53(4):845-849.

21. Meyer, D. Árvores evolutivas Humanas: Uma discussão sobre inferência filogenética [Human evolutionary trees: A discussion on phylogenetic interference]. *Série Monografias*, 1993;3.

22. Rohlf FJ. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software, New York, 2000, 98p.

24. Coelho, A.S.G. Avaliação de dendrogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através de procedimento de bootstraps. BOOD 3.03> [Assessment of dendrograms based on estimates of the genetic distances/similarities by means of the bootstraps procedure. BOOD 3.03] Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás [Department of General Biology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Goiás]. Goiânia, GO,2005.

25. Chen CC, Teng LJ, Chang TC. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by sequence analysis of the 16S-23S ribosomal DNA spacer region. J Clin Microbiol 2004;42(6):2651-7.

23. Felsenstein J. Phylip (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. DNAPARS-DNA Parsimony Program. Seattle distributed by the author department of Genetics, University of Washington (1986-1993).

26. Oho T, Yamashita Y, Shimazaki Y, Kushiya M, Koga T. Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(4):258-62.
27. Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. *Clin Chem* 2005;51(1):35-9.
28. Staden R, Judge DP, Bonfield JK. Sequence assembly and finishing methods. *Methods Biochem Anal* 2001;43:303-22.
29. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 1994;22(22):4673-4680.
30. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 2004;5:150-163.
31. Kreth J, Meritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus Sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 2005;187(21):7193-7203.
32. Alaluusua S, Matto J, Gronroos L, Innila S, Torkko H, Asikainen S, Jousimies-Somer H, Saarela M. Oral colonization by more than one clonal type of *Mutans streptococci* in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol* 1996;41:167-73.

33. Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser BJ. Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics* 2011;4:22.
34. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011;45(1):69-86.
35. Chia JS, Hsu TY, Teng LJ, Chen JY, Hahn LJ, Yang CS. Glucosyltransferase gene polymorphism among *Streptococcus mutans* strains. *Infect Immun* 1991;59(5):1656-60.
36. Yamashita Y, Bowen WH, Kuramitsu HK. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain exhibiting polymorphism in the tandem *gtfB* and *gtfC* Genes. *Infect Immun* 1992;60(4):1618-1624
37. Chia JS, Yang CS, Chen JY. Functional analyses of a conserved region in glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 1998;66(10):4797-803.
38. Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, Hamada S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* MT8148. *J Dent Res* 2002;81(2):109-113.

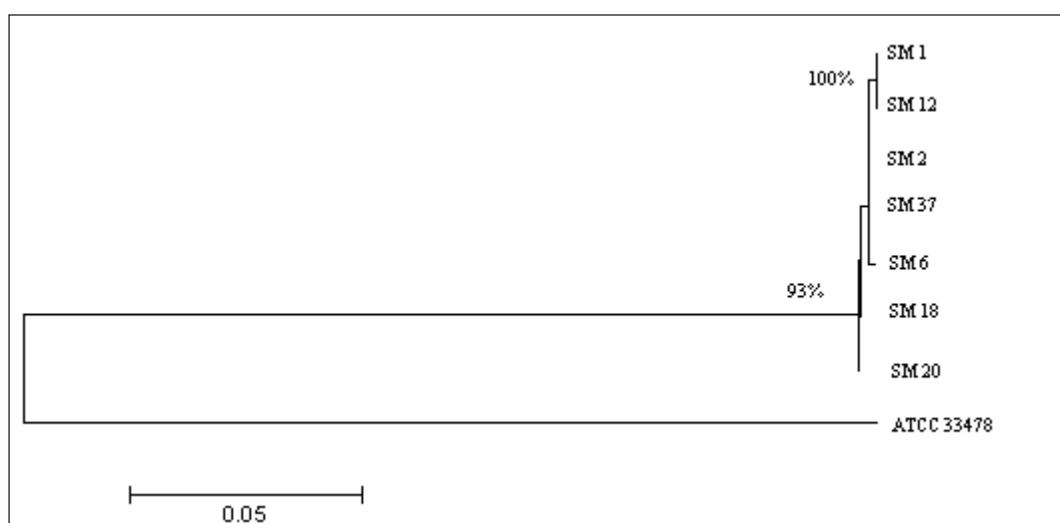


Figure 1. Sequence analyses of the 16S-23S IGS region of various *S. mutans* isolates (SM1, SM2, SM6, SM12, SM18, SM20 and SM37) and reference strain *S. sobrinus* ATCC 33478. The tree was constructed using the neighbor-joining method (two-parameter Kimura).

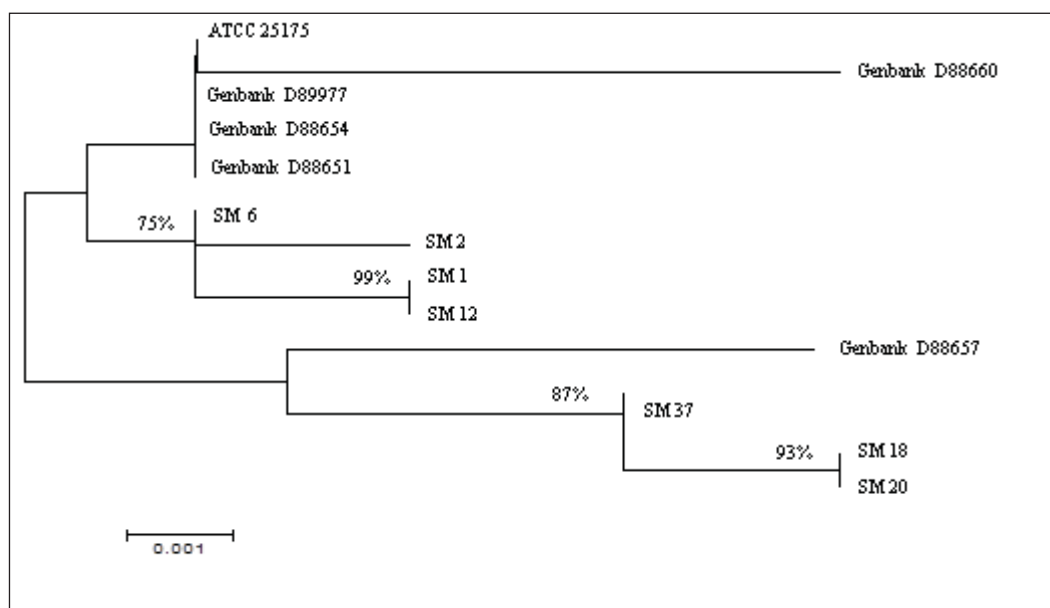


Figure 2. Partial sequencing of the *gtfB* gene of *S. mutans* grouped using the neighbor-joining method (two-parameter Kimura); *S. mutans* strain ATCC 25175 was used as a reference; SM 1 to SM 37 isolates of *S. mutans*; D88651 to D89977 represents the nucleotide sequences of the *gtfB* region of *S. mutans* deposited in GenBank.

ANEXO III

SUBMISSÃO DAS SEQUÊNCIAS *gtfB*

EUROPEAN NUCLEOTIDE ARCHIVE

> Accession#: HE962158

> Status: confidential until 21-AUG-2012

> Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 1 ID HE962158; SV 1; linear; genomic DNA; STD; PRO; 474 BP.

> ST * private 21-AUG-2012> AC HE962158;

> DT 06-JUL-2012 (Rel. 113, Created)

> DT 06-JUL-2012 (Rel. 113, Last updated, Version 0)

> DE *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 1

> KW .

> OS *Streptococcus mutans*

> OC Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Streptococcaceae; *Streptococcus*.

> RN [1]

> RP 1-474

> RA Moreira M.;

> RL Submitted (05-JUL-2012) to the INSDC.

> RL Basic Pathology Department, UFPR, Box:19031, 81.531-980, BRAZIL.

> RA Moreira M., Barbieri D.S.V., Neiva I.F., Klisiowicz D.R., Vicente V.A.;

> RT "Molecular characterization of beta glucosyltransferase gene in *Streptococcus mutans* isolated from families at high risk for dental caries";

> RL Unpublished.

> FH Key Location/Qualifiers

> FT source 1..474

> FT /organism="*Streptococcus mutans*"> FT /isolate="1"

> FT /mol_type="genomic DNA"> FT /db_xref="taxon:1309"

> FT CDS <1..>474> FT /codon_start=2> FT /transl_table=11> FT /gene="*gtfB*"

> FT /product="beta glucosyltransferase"

> FT /protein_id="CCJ09423.1"

> FT /translation="KADSNESKSKQISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH

> FT TVTTSSSSTSVNPKVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA

> FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNKGKVRTNFTLIADGKILHF"

> SQ Sequence 474 BP; 182 A; 79 C; 79 G; 134 T; 0 other;

> taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttcta gattctaata ccagtgtgt 60

> tactgcta atgaatacta atgaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120

> tagtcaaaact aatcatcacag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180

> agagggtgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240

> aaatcaaaca actacagttg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaaca 300

> aacaaccgaa gctgatacag atgtattga tgatagcaat gcagccaatc tacaatat 360

> ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420

> caaagttcgt actaatatta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttga 474

> Accession#: HE962159

> Status: confidential until 21-AUG-2012

> Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 2
 /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEVTSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTISSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGK"
 > SQ Sequence 462 BP; 180 A; 76 C; 76 G; 130 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagtgcaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaat cagtagctct acttcagtag ttaatcccaa 180
 > agaggttgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatatcaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaatat 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacg 420
 > caaagttcgt actaattta cattaattgc tgatggcaaa at 462

> Accession#: HE962160
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 3
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEVTSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTISSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 186 A; 80 C; 81 G; 141 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagtgcaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaat cagtagctct acttcagtag ttaatcccaa 180
 > agaggttgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatatcaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaatat 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacg 420
 > caaagttcgt actaattta cattaattgc tgatggcaaa atttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962161
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 4
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKILHF"
 > SQ Sequence 472 BP; 181 A; 79 C; 78 G; 134 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ccagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agaggttgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatatcaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaatat 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacg 420
 > caaagttcgt actaattta cattaattgc tgatggcaaa atttacatt tt 472

> Accession#: HE962162

> Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 5
 > FT /translation="KADSNESKSKISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYYDNNGKVRTNFT"
 > SQ Sequence 443 BP; 172 A; 75 C; 74 G; 122 T; 0 other;
 > taaagcagat tcaatgaat cgaaatccca aatttcaat gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgcta atgaatccta atgaacaac cgaagcgaca tcaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatcacag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaatcctt atactgttg ggaacagct tcaatgggtg aaaagcttca 240
 > aaatcaaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatttta cat 443

> Accession#: HE962163
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 6
 > FT /translation="KADSNESKSKISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYYDNNGKVRTNFTLIA"
 > SQ Sequence 452 BP; 174 A; 77 C; 76 G; 125 T; 0 other;
 > taaagcagat tcaatgaat cgaaatccca aatttcaat gattctaata ccagtgtgt 60
 > tactgcta atgaatccta atgaacaac cgaagcgaca tcaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatcacag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaatcctt atactgttg ggaacagct tcaatgggtg aaaagcttca 240
 > aaatcaaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatttta cattaattgc tg 452

> Accession#: HE962164
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 7
 > FT /translation="KADSNESKSKISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYYDNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 185 A; 81 C; 83 G; 139 T; 0 other;
 > taaagcagat tcaatgaat cgaaatccca aatttcaat gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgcta atgaatccta atgaacaac cgaagcgaca tcaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatcacag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaatcctt atactgttg ggaacagct tcaatgggtg aaaagcttca 240
 > aaatcaaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatttta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962165
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 8
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANIQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 186 A; 80 C; 83 G; 139 T; 0 other;
 > taaagcagat tcaatgaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttgg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatcaaaca actacagttg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaata tacaaatatt 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatatta cattaattgc tgatggcaaa atttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962166
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 9
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANIQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 186 A; 80 C; 83 G; 139 T; 0 other;
 > taaagcagat tcaatgaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttgg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatcaaaca actacagttg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaata tacaaatatt 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatatta cattaattgc tgatggcaaa atttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962167
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 10
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADG"
 > SQ Sequence 456 BP; 175 A; 76 C; 78 G; 127 T; 0 other;
 > taaagcagat tcaatgaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttgg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatcaaaca actacagttg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420

> caaagttcgt actaatTTta cattaattgc tgatgg 456

> Accession#: HE962168
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 11
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEVTSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTISSSTS VVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYYDNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 186 A; 80 C; 81 G; 141 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaatgaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgttgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagtgcaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaat cagtagctct acttcagtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aaatcaaaca actacagttg acaaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaatatatt 360
 > ggaaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatTTta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962169
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 12
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEVTSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTISSSTS VVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYYDNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 486 BP; 186 A; 80 C; 81 G; 139 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaatgaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgttgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagtgcaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaat cagtagctct acttcagtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aaatcaaaca actacagttg acaaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaatatatt 360
 > ggaaaaaactt ccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatTTta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgc 486

> Accession#: HE962170
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 13
 > FT /translation="KADSNESKSQISNDSNTSVVTANEESNVTTEVTSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTISSSTS VVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYYDNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 186 A; 80 C; 81 G; 141 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaatgaat cgaaatccca aatttctaatt gattctaata ctagtgttgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagtgcaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaat cagtagctct acttcagtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aaatcaaaca actacagttg acaaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300

> aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaaactt cccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatTTta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962171
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 14
 > FT /translation="KADSNESKSKISNDSNTSVVTANEESNVTTEVTSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTISSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKI"
 > SQ Sequence 465 BP; 180 A; 76 C; 76 G; 133 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttctaata gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagtgcaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaat cagtagctct acttcagtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatcaaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaaactt cccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatTTta cattaattgc tgatggcaaa atttt 465

> Accession#: HE962172
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 15
 > FT /translation="KADSNESKSKISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 185 A; 81 C; 83 G; 139 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttctaata gattctaata ctagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180
 > agagggtgta agtaaatcctt atactgttg ggaacagct tctaattgtg aaaagcttca 240
 > aatcaaaca actacagtg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaca 300
 > aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
 > ggaaaaaactt cccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
 > caaagttcgt actaatTTta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttgatgaaac 480
 > tggcgctt 488

> Accession#: HE962173
 > Status: confidential until 21-AUG-2012
 > Description: *Streptococcus mutans* partial *gtfB* gene for beta glucosyltransferase, isolate 16
 > FT /translation="KADSNESKSKISNDSNTSVVTANEESNVTTEATSKQEAASSQTNH
 > FT TVTTSSSSTSVVNPKEVVSNPYTVGETASNGEKLQNQTTTVDKTSEAAANNISKQTTEA
 > FT DTDVIDDSNAANLQILEKLPNVKEIDGKYYYDNNNGKVRTNFTLIADGKILHFDETGA"
 > SQ Sequence 488 BP; 185 A; 82 C; 83 G; 138 T; 0 other;
 > taaagcagat tctaataaat cgaaatccca aatttctaata ccagtgtgt 60
 > tactgctaata gaagaatcta atgtaacaac cgaagcgaca tctaagcaag aagctgctag 120
 > tagtcaaact aatcatatag taacgacaag cagtagctct acttcggtag ttaatcccaa 180

> agaggttgta agtaatcctt atactgttgg ggaaacagct tctaattggtg aaaagcttca 240
> aaatcaaaca actacagtgg acaaaacttc tgaagctgct gctaataata ttagtaaaca 300
> aacaaccgaa gctgatacag atgttattga tgatagcaat gcagccaatc tacaaatatt 360
> ggaaaaactt cccaatgtaa aagaaattga tggtaagtat tattattatg acaataacgg 420
> caaagttcgt actaatttta cattaattgc tgatggcaaa attttacatt ttgatgaaac 480
> tggcgctt 488